



HAL
open science

Les lymphocytes T CD8 innés et immunosurveillance antitumorale : application au modèle de la leucémie myéloïde chronique

Emilie Cayssials

► **To cite this version:**

Emilie Cayssials. Les lymphocytes T CD8 innés et immunosurveillance antitumorale : application au modèle de la leucémie myéloïde chronique. Médecine humaine et pathologie. Université de Poitiers, 2020. Français. NNT : 2020POIT1407 . tel-03220105

HAL Id: tel-03220105

<https://theses.hal.science/tel-03220105v1>

Submitted on 7 May 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.

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté de Médecine et de Pharmacie)

(Diplôme National – Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Emilie CAYSSIALS-CAYLUS

Les lymphocytes T CD8 innés et immunosurveillance antitumorale : application au modèle de la leucémie myéloïde chronique

Directeurs de Thèse :

Jean-Marc GOMBERT

André HERBELIN

Soutenue le 11/12/2020

devant la Commission d'Examen

JURY

Dr Emmanuel SCOTET : Rapporteur

Dr Christophe PAGET : Rapporteur

Pr Philippe ROUSSELOT : Examineur

Pr Nicolas BOURMEYSTER : Examineur

Dr Anaïs LEVESCOT : Examinatrice

Dr André HERBELIN : Directeur de Thèse

Pr Jean-Marc GOMBERT : Co-directeur de Thèse

A Agathe et Kevin, deux étoiles filantes qui me manquent beaucoup, je pense très souvent à vous,

A Roger et Jean, deux merveilleuses personnes que je n'oublierai jamais,

A mes parents qui me soutiennent depuis le début de mon parcours en médecine et qui m'aident à traverser toutes les épreuves de la vie,

A mon fils et mon mari qui m'accompagnent et m'encouragent au quotidien,

A mes patients avec lesquels je partage des instants de vie,

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'y participer et qui ont donné de leur temps pour évaluer mon travail de thèse.

Je remercie vivement les Docteurs Emmanuel Scotet et Christophe Paget d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu y porter.

J'exprime ma gratitude au Professeur Philippe Rousselot, qui me fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de mon admiration pour sa carrière et de ma reconnaissance pour nos riches échanges et son aide précieuse sur le plan clinique.

J'adresse tous mes remerciements au Professeur Bourmeyster pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et aussi pour notre collaboration sur la LMC.

J'adresse également mes remerciements au Docteur Anaïs Levescot d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse. Son parcours de chercheur m'impressionne et je suis très heureuse de la retrouver à cette occasion.

Je remercie sincèrement et chaleureusement le Professeur Jean-Marc Gombert et le Docteur André Herbelin d'avoir encadré ce travail. Un grand merci de m'avoir fait découvrir et apprécier la recherche fondamentale en immunologie, dont je ne saurai me passer à présent. Toutes ces années ont été très enrichissantes, les épreuves traversées m'ont rendu plus forte et je suis très heureuse de porter une partie du projet articulé autour de la LMC pour les années à venir. Merci pour toute l'aide et le soutien que vous m'avez apportés tant sur le plan scientifique que pour ma carrière universitaire.

Je tiens à remercier Aurélie Robin de m'avoir initié et formé au travail expérimental de recherche ; j'ai pu apprécier ses compétences, sa rigueur, et son énergie. Qu'elle reçoive ici

l'expression de ma reconnaissance pour ses encouragements en toutes circonstances et de ma sincère amitié.

Je remercie vivement Nathalie Piccirilli sans laquelle je n'aurai pu mener à bien mes projets. Son travail de grande qualité et sa bienveillance se sont révélés être des atouts majeurs.

Je remercie Florence Jacomet pour l'aide qu'elle m'a apportée au cours de mon parcours et pour son humeur positive,

Je tiens à remercier tous les membres de l'unité INSERM 1082 en particulier Alice Barbarin pour son assistance et son soutien ainsi que Laurène Daniel pour sa disponibilité.

J'adresse tous mes remerciements au Professeur Thierry Hauet et plus récemment au Professeur Luc Pellerin de m'avoir accueillie tous deux dans leur unité de recherche.

J'exprime ma gratitude au Professeur Xavier Leleu pour son accompagnement et son énergie. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier chaleureusement tous mes collègues du service d'hématologie du CHU de Poitiers qui sont tous et toutes des personnes en « or » : à Jose et Pilar, un grand merci pour votre réconfort en toutes circonstances et le « trinôme » que l'on forme, un grand merci à Natacha, Cécile, Vincent, Thomas, Déborah et Niels. C'est parce que vous avez accepté et « subi » que du temps me soit dégagé, que j'ai pu mener à bien ce travail. Enfin, un grand merci à Stéphanie pour son soutien depuis 5 ans et pour avoir supporté mes états d'âme.

Un immense merci à Christine Giraud pour sa générosité et son appui sans faille.

J'adresse mes sincères remerciements à Jean-Claude Chomel pour son expertise scientifique, nos collaborations dans la LMC, sa disponibilité et l'aide précieuse qu'il m'apporte depuis de nombreuses années.

Je remercie le Professeur Guilhot d'avoir bien voulu me transmettre ses vastes connaissances en matière de LMC ainsi que pour son appui tout au long de mon parcours. Qu'il reçoive ici l'expression de ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également au Docteur Lydia Roy pour son enseignement et son soutien.

J'adresse tous mes remerciements au groupe d'expert Fi-LMC et à ses membres pour tout le soutien apporté sur le plan de la recherche clinique et fondamentale.

Je tiens à remercier l'équipe du CIC dirigée par le Professeur René Robert, en particulier Véronique Martin de Montaudry, Elodie Migault, Stéphanie Ragot et Pierre-Jean Saulnier pour nos enrichissantes collaborations sur la LMC.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Frédéric Beck, directeur de l'Ecole Doctorale Biosanté et Madame Sophie Bergeronneau, secrétaire de l'Ecole Doctorale pour leur accompagnement.

Merci à Sabrina, Elodie, Caroline et Thibault du service d'hématologie biologique pour votre soutien et votre bienveillance.

Merci aux secrétaires et aux infirmières du service d'hématologie en particulier Vanessa, Lucie, Claire, Emilie, Karine et Séverine, pour votre aide dans mon travail hospitalier, ce qui m'a permis de réaliser ce travail.

Mes derniers remerciements s'adressent à mes amis pour leurs encouragements en particulier Marion, Aurore, Mariannick, et Julie.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	6
TABLE DES FIGURES	8
LISTE DES ABBREVIATIONS	9
AVANT-PROPOS	12
PREAMBULE GENERAL.....	15
INTRODUCTION GENERALE.....	18
PARTIE I - IMMUNOSURVEILLANCE ET IMMUNOEDITION DES CANCERS	18
I. <i>Principe de l'immunosurveillance antitumorale et la théorie des 3 E</i>	18
II. <i>Arguments expérimentaux et observationnels cliniques en faveur de la théorie de l'immunosurveillance et de l'immunoédition des cancers</i>	19
II.1. Chez la Souris	19
II.2. Chez l'Homme.....	20
III. <i>Les antigènes tumoraux chez l'Homme</i>	21
IV. <i>Rôle des effecteurs de l'immunité innée dans la réponse immunitaire antitumorale</i>	24
IV.1. Les DC.....	24
IV.2. Les cellules NK.....	27
V. <i>Priming et activation des LT au cours de la réponse immunitaire antitumorale</i>	31
V.1. Introduction	31
V.2. Rôle essentiel des LT mémoires dans l'immunité antitumorale	32
VI. <i>Mécanismes d'échappement des cancers à la réponse immunitaire antitumorale</i>	35
PARTIE II - LES LYMPHOCYTES T NON CONVENTIONNELS.....	40
I. <i>Introduction</i>	40
II. <i>Le gradient d'« innateness » des LT</i>	42
III. <i>Définition et activité antitumorale des différentes populations de LT innés</i>	44
III.1. Les iNKT.....	44
III.2. Les LT- $\gamma\delta$	49
III.3. Les MAIT	52
III.4. Les LT CD8 mémoires non conventionnels	54
PARTIE III - LA LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE.....	67
I. <i>Introduction</i>	67
II. <i>Physiopathologie de la LMC</i>	68
III. <i>Diagnostic biologique</i>	70
III.1. Hémogramme	70
III.2. Myélogramme et analyse cytogénétique.....	70
III.3. Biologie moléculaire	70
IV. <i>Scores pronostiques</i>	71
V. <i>Traitement de la LMC</i>	71
V.1. Historique	71
V.2. Les ITK.....	72
V.3. Les inhibiteurs allostériques	74
VI. <i>Surveillance et suivi de la maladie</i>	74
VII. <i>Stratégies d'arrêt de traitement par ITK</i>	75

VIII.	<i>Le SI et la LMC</i>	77
VIII.1.	Introduction.....	77
VIII.2.	Anomalies du SI au diagnostic de la LMC.....	77
VIII.3.	Immunogénicité de la LMC.....	80
VIII.4.	Evolution de la réponse immunitaire sous traitement par ITK et effets immunomodulateurs des ITK 81	81
VIII.5.	SI et arrêt du traitement dans la LMC.....	83
OBJECTIFS DE TRAVAIL		84
RÉSULTATS		85
PARTIE I - MANUSCRIT 1 : THE HYPOTHESIS OF THE HUMAN INKT/INNATE CD8(+) T-CELL AXIS APPLIED TO CANCER: EVIDENCE FOR A DEFICIENCY IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA		85
PARTIE II - MANUSCRIT 2 : SUSTAINED TREATMENT-FREE REMISSION IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA IS ASSOCIATED WITH AN INCREASED FREQUENCY OF INNATE TCD8 T-CELLS		99
PARTIE III - MANUSCRIT 3 : PHENOTYPE OF NK-LIKE CD8(+) T CELLS WITH INNATE FEATURES IN HUMANS AND THEIR RELEVANCE IN CANCER DISEASES		113
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES		136
LES LT CD8 INNES EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES CHEZ L'HOMME		138
I.1.	CD49d, une signature des LT CD8 innés chez l'Homme ?	138
I.2.	Répertoire TCR des LT CD8 innés, comment examiner son caractère autoréactif ?	138
I.3.	Perte du potentiel prolifératif des LT CD8 VM chez l'Homme et la Souris avec l'avancée en âge : sénescence ou exhaustion ?	139
LT CD8 INNES ET CANCERS.....		140
I.1.	Les LT CD8 innés et la réponse anti-leucémique au cours de la LMC.....	141
I.2.	Implication des LT CD8 innés dans l'immunosurveillance d'autres cancers ?.....	158
CONCLUSION GENERALE.....		160
BIBLIOGRAPHIE		162
ANNEXES		180
ANNEXE 1 : JACOMET ET AL., EUR.J. IMMUNOL. 2015		180
ANNEXE 2 : ROSSIGNOL ET AL., EUR. J. IMMUNOL. 2012		188
ANNEXE 3 : BASBOUS ET AL., J PATHOL 2016		194
ANNEXE 4 : CARACTERISTIQUES DES PATIENTS DE LA COHORTE INCLUSE DANS L'ESSAI DASATINIB-PEGIFN		200

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : LES DIFFERENTES CLASSES D'ANTIGENES TUMORAUX RECONNUS PAR LES LT (COULIE ET AL., 2014).	23
FIGURE 2 : LES DC ET IMMUNITE ANTITUMORALE T CD8 (GARDNER A AND RUFFELL B, 2016).	25
FIGURE 3 : REGULATION DE LA CYTOTOXICITE DES CELLULES NK EN SITUATION D'IMMUNOSURVEILLANCE ANTITUMORALE ET D'ECHAPPEMENT TUMORAL (PAHL J AND CERWENKA A, 2017).	31
FIGURE 4 : LES STADES DE DIFFERENCIATION DES LT CD8 AU COURS DE LA REPOSE IMMUNITAIRE ANTITUMORALE (CHEN AND MELLMAN, 2017).	35
FIGURE 5 : MECANISMES D'ECHAPPEMENT DES TUMEURS AU SI (BEATTY GL AND GLADNEY WL, 2015).	36
FIGURE 6 : LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUVANT INFLUER SUR LE CYCLE DE L'IMMUNITE ANTITUMORALE (CHEN DS AND MELLMAN I, 2013).	38
FIGURE 7 : LES MULTIPLES FACTEURS INFLUENÇANT LA MISE EN PLACE D'UNE IMMUNITE PROTECTRICE <i>VERSUS</i> UN ETAT DE TOLERANCE DU SI AU COURS DES CANCERS (CHEN AND MELLMAN, 2017).	39
FIGURE 8 : DELAI DE REPOSE PRIMAIRE ET SECONDAIRE A UNE STIMULATION INFECTIEUSE DES LT CONVENTIONNELS <i>VERSUS</i> NON CONVENTIONNELS (GODFREY ET AL., 2015).	40
FIGURE 9 : CARACTERISTIQUES DES LT CONVENTIONNELS (« MHC-RESTRICTED T CELLS ») <i>VERSUS</i> CELLES DES LT NON CONVENTIONNELS (GODFREY ET AL., 2015).	41
FIGURE 10 : LES DIFFERENTES POPULATIONS DE LT INNES EN FONCTION DE LEURS MOLECULES DE RESTRICTION (GODFREY ET AL., 2018).	42
FIGURE 11 : LES LT INNES CHEZ L'HOMME (GUTIERREZ-ARCELUS M ET AL., 2019).	43
FIGURE 12 : LES LT INNES ONT UN POTENTIEL D'EXPRESSION DE L'IFN- γ ACCRU ET UN POTENTIEL DE PROLIFERATION REDUIT (GUTIERREZ-ARCELUS M ET AL., 2019).	43
FIGURE 13 : MECANISME D'ACTIVATION DES INKT (GODFREY ET AL., 2018).	46
FIGURE 14 : LES DIFFERENTES POPULATIONS DE LT CD8 MEMOIRES CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS (MARTIN AND BADOVINAC, 2018).	54
FIGURE 15 : LYMPHOCYTE T CD8 ⁺ TCR-AB ⁺ « <i>INNATE MEMORY</i> » (LEE ET AL., 2011).	56
FIGURE 16 : FORMATION DU CHROMOSOME PHILADELPHIE PAR TRANSLOCATION RECIPROQUE ET EQUILIBREE T(9;22) ABOUTISSANT SUR LE PLAN MOLECULAIRE A LA FORMATION DE L'ONCOGENE <i>BCR-ABL1</i> .	68
FIGURE 17 : HISTORIQUE DES TRAITEMENTS DE LA LMC (BUSULFAN, HYDROXUUREE, LES DIFFERENTS ESSAIS DE L'INTERFERON- α , ET DE L'IMATINIB) ET SURVIE GLOBALE DES PATIENTS (SOREL N ET AL., 2017).	72
FIGURE 18 : RECOMMANDATIONS DU GROUPE FRANÇAIS FI-LMC CONCERNANT L'ARRET DE TRAITEMENT PAR ITK DANS LA LMC...	76
FIGURE 19 : ALTERATION NUMERIQUE ET FONCTIONNELLE (SIGNATURE EOMES ET CD49D) DES LT CD8 INNES CHEZ LES PATIENTS AU DIAGNOSTIC DE LA LMC-PC.	146
FIGURE 20 : RESTAURATION NUMERIQUE ET FONCTIONNELLE DES LT CD8 INNES DES LE 3 ^{EME} MOIS DE TRAITEMENT.	147
FIGURE 21 : L'OBTENTION D'UNE REPOSE MOLECULAIRE PROFONDE (DMR) APRES 12 MOIS DE TRAITEMENT (M12) EST ASSOCIEE A UNE FREQUENCE ELEVEE DE LT CD8 INNES A M3.	148
FIGURE 22 : UNE FREQUENCE ELEVEE DE LT CD8 INNES A M3 EST ASSOCIEE A UNE PROBABILITE SUPERIEURE D'OBTENIR UNE DMR PRECOCE ET DURABLE.	148
FIGURE 23 : ANALYSE QUANTITATIVE ET FONCTIONNELLE DES LT CD8 INNES (EOMES ⁺ KIR/NKG2A ⁺) DANS LA COHORTE PROSPECTIVE D'ARRET DE TRAITEMENT (N=20).	151
FIGURE 24 : LA REDUCTION DE LA MASSE TUMORALE (OBTENTION D'UNE DMR STABLE) ET LA RESTAURATION D'UN ETAT D'IMMUNOSURVEILLANCE SONT LES DEUX PILIERS D'UNE TFR PROLONGEE.	153

LISTE DES ABBREVIATIONS

-/- (ou KO pour knockout)	délétion homozygote par recombinaison homologue
ABL1	Abelson
AC	anticorps
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
αGC	α galactosylcéramide
ATP	adénosine triphosphate
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CBP	<i>C-AMP response element binding protein</i>
CMF	cytométrie en flux
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMN	cellules mononucléées
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
CSH	cellule souche hématopoïétique
CTL	<i>cytotoxic lymphocyte T</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DLI	<i>donor lymphocyte infusion</i>
DMR	<i>deep molecular response</i>
EBV	<i>epstein barr virus</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELTS	<i>eutos long term survival</i>
EMRA	mémoire effecteur avec différenciation terminale
Eomes	Eomesodermin
Fas-L	ligand du récepteur Fas
GVL	<i>graft versus leukemia</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
ICI	<i>immune check-points inhibitors</i>
ICP	<i>immune check-points</i>
Id3	<i>inhibitor of DNA binding 3</i>
IFN-α	interféron-alpha
IFN-γ	interféron-gamma
IM	<i>innate memory</i>
iNKT	<i>invariant natural killer T</i>

IPP	isopentéryl pyrophosphate
ITK	inhibiteur de tyrosine kinase
Itk-/-	souris KO pour « <i>Inductible T cell kinase</i> »
ITK-2G	Inhibiteur de tyrosine kinase de deuxième génération
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
Klf	<i>Kruppel-like factor</i>
LAA	antigènes associés aux leucémies
LB	lymphocyte B
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LCMV	<i>lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LMC	leucémie myéloïde chronique
LMC-PC	leucémie myéloïde chronique en phase chronique
LT	lymphocyte T
LTreg	lymphocytes T régulateurs
MAIT	<i>mucosa associated invariant T</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MCA	méthylcholanthrène
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MICA	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>
MM	myélome multiple
MMR	<i>major molecular remission</i>
MR	<i>molecular response</i>
MR1	<i>major histocompatibility complex classI-related protein 1</i>
NK	<i>natural killer</i>
PA	phase accélérée
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PB	phase blastique
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PC	phase chronique
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
Ph	chromosome Philadelphie
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zinc finger protein</i>
PMA	<i>phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PNN	polynucléaire neutrophile
RCyC	réponse cytogénétique complète
RCyM	réponses cytogénétiques majeures
RFS	<i>relapse free survival</i>
Rlk	<i>resting lymphocyte kinase</i>

SEM	<i>standard error of the mean</i>
SLAM	<i>signaling lymphocytic activation molecule</i>
SI	<i>système immunitaire</i>
SP	<i>simple positif</i>
TAM	<i>tumor-associated macrophage</i>
T-box	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
Tec	<i>tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma</i>
TFR	<i>treatment-free remission</i>
Th	<i>T helper</i>
TRAIL	<i>tumour necrosis-factor-related apoptosis</i>
Trm	<i>tissue resident memory T-cell</i>
TIL	<i>lymphocytes infiltrant la tumeur</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VM	<i>virtual memory</i>
WT1	<i>Wilms tumour 1</i>

AVANT-PROPOS

Une nouvelle approche thérapeutique du cancer a pris son essor depuis quelques années : l'immunothérapie. L'évolution de nos connaissances fondamentales sur l'immunologie des tumeurs a en effet permis de développer différentes stratégies permettant de promouvoir la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales par le SI (pour système immunitaire) plutôt que de s'attaquer directement aux cellules tumorales à l'instar de la chimiothérapie conventionnelle.

De nombreuses pistes restent à explorer pour agir sur le SI et améliorer les réponses antitumorales. L'approfondissement de nos connaissances sur les mécanismes d'immunosurveillance permet d'identifier les effecteurs de l'immunité antitumorale et des biomarqueurs prédictifs du succès des stratégies d'immuno-intervention.

La plupart des approches d'immunothérapies développées ces dernières années ont attiré au ciblage des lymphocytes T (LT) conventionnels CD8 et CD4 qui reconnaissent des peptides antigéniques présentés respectivement par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II. Cependant, les LT non conventionnels tels que les iNKT (*invariant natural killer T*), MAIT (*mucosa associated invariant T*), et LT- $\gamma\delta$ sont également impliqués dans l'immunosurveillance antitumorale. Mais les stratégies de valorisation de leurs propriétés antitumorales restent à ce jour encore peu explorées. Les sous types lymphocytaires T non conventionnels sont pour certains d'entre eux bien décrits à la fois chez l'Homme, la Souris, ou dans d'autres espèces, tandis que pour d'autres l'existence d'équivalent humain reste en suspens.

Ce travail de thèse d'université s'inscrit dans une continuité avec de précédents travaux menés au sein du laboratoire auxquels j'ai pu participer, notamment en tant que stagiaire de master II durant mon année recherche. En effet, mon laboratoire d'accueil a décrit de manière

princeps en 2015 un nouveau sous type de LT non conventionnels ou T innés au sein du compartiment des LT CD8 mémoires périphériques, les cellules T CD8⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺ (pour *T cell receptor*) Eomes⁺ (pour Eomesodermin) KIR/ NKG2A⁺ (pour *killer cell immunoglobulin-like receptor*), comme potentiel équivalent humain de LT dénommés « *innate memory* » (IM) identifiés chez la souris au début des années 2000 (Jacomet et al., 2015) (**Annexe 1**). Pour cela, nous avons étudié chez l'Homme adulte, dans le sang périphérique, les LT CD8 exprimant des marqueurs phénotypiques de cellules « *natural killer* » (NK) : les LT CD8 KIR/NKG2A⁺ (représentant dans notre étude 7,5% des LT CD8 totaux). Les récepteurs KIR appartiennent à la superfamille des immunoglobulines ; ils reconnaissent les molécules de classe I du CMH et peuvent ainsi réguler l'activation des cellules NK de manière positive ou négative. La molécule NKG2A est un récepteur des cellules NK inhibiteur qui appartient à la superfamille des lectines et qui a pour ligand la molécule HLA-E (molécule non polymorphique du CMH de classe I).

Nous avons montré que ce contingent LT CD8 KIR/NKG2A⁺ concentre, par rapport au compartiment des LT CD8 KIR/NKG2A⁻, l'expression du facteur de transcription Eomes responsable chez la Souris de la différenciation des LT IM. Nous avons ensuite étudié les propriétés fonctionnelles non dépendantes de l'activation du TCR ou *innate-like* des cellules T CD8 Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺, à savoir la sécrétion d'interféron-gamma (IFN- γ) en réponse à une stimulation de type *innate-like* (stimulation par la combinaison des cytokines pro-inflammatoires IL-12+IL-18) et leur activité cytolytique dans un système de cytotoxicité redirigée dépendante de CD16 et de cytotoxicité dirigée contre une cible naturelle des cellules NK, les cellules K562 (absence d'expression des molécules de classe I du CMH). Nous avons montré que ces fonctions *innate-like* (ou *NK-like*) sont très significativement associées au phénotype Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ au sein du compartiment des LT CD8 périphériques. De plus, nous avons mis en évidence que le contingent T CD8 Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ avait un phénotype de mémoire effecteur avec différenciation terminale (EMRA) : CD45RA⁺ CCR7⁻

CD57⁺. Nous avons par ailleurs observé que 60% des LT CD8 Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ coexpriment le facteur de transcription T-bet, qui est, à l'instar d'Eomes, un facteur de transcription de la famille T-box (*T-box expressed in T cells*) impliqué dans l'activation et la différenciation des LT CD8 en cellules effectrices et en cellules mémoires. Pour démontrer que le phénotype mémoire était acquis indépendamment de la rencontre d'un antigène étranger, soit l'appartenance à la catégorie des LT innés (caractérisés par un phénotype mémoire sans expérience antigénique), nous avons étudié ce contingent dans un système dépourvu de stimulation antigénique exogène : le sang de cordon placentaire. Nous avons, dans ce contexte, observé la présence de LT CD8 Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ (0,7 à 1,7% des LT CD8 *versus* 2,5% en périphérie chez l'adulte), avec sur le plan fonctionnel une capacité de sécrétion de l'IFN- γ en réponse à une stimulation de type IL12+IL-18 et à une stimulation de type PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*)-ionomycin responsable d'une activation polyclonale des LT. Etant donné la relation, chez la Souris, entre la sécrétion d'IL-4 par les NKT exprimant le facteur de transcription PLZF (pour *promyelocytic leukemia zinc finger protein*) notamment les iNKT et la génération des LT CD8 IM, nous avons recherché et décrit une corrélation entre la fréquence des LT CD8⁺ KIR/NKG2A⁺ exprimant Eomes et la fréquence des cellules CD3⁺ exprimant PLZF, évoquant ainsi une possible implication chez l'Homme également des LT PLZF⁺ dans la genèse des LT CD8 mémoires possédant un phénotype et des fonctions de LT innés.

Grâce à des études menées à la fois en situation physiologique et pathologique, notre objectif général a été, par la suite, de progresser dans la caractérisation chez l'Homme de cette population T mémoire non conventionnelle ou « *innate-like* » constituée par les LT CD8 Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺. Nous nous sommes en particulier attachés à l'étude du potentiel d'effecteur antitumoral de ces cellules que nous avons finalement dénommées « LT CD8 innés ».

PREAMBULE GENERAL

Nous avons donc précédemment montré chez le sujet sain que les LT CD8 innés possédaient des fonctions *NK-like* compatibles avec un potentiel rôle d'effecteur de l'immunité antitumorale. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que ce nouveau contingent cellulaire T inné est impliqué dans l'immunosurveillance antitumorale chez l'Homme. Comme modèle physiopathologique, nous avons choisi la leucémie myéloïde chronique (LMC) car il s'agit par de multiples aspects d'une pathologie « modèle » en cancérologie :

- un évènement oncogénique caractéristique facilement indentifiable et mesurable est à l'origine de la pathogénie de cette hémopathie : la formation du chromosome Philadelphie au sein de CSH (pour cellules souches hématopoïétiques) conduisant sur le plan moléculaire à la formation de l'oncogène de fusion *BCR-ABL1*,
- la prise en charge thérapeutique repose sur une thérapie ciblée, non curative, constituée par les ITK (pour inhibiteurs de tyrosine kinase), qui permettent de maintenir la maladie en PC (pour phase chronique) et d'obtenir, en fonction des patients, des réponses moléculaires plus ou moins profondes,
- la capacité du SI à participer au contrôle de la maladie est étayée par plusieurs arguments expérimentaux que nous développerons,
- et enfin, certains patients sont en situation de rémission durable après arrêt de leur ITK en dépit de la persistance d'une maladie résiduelle (compartiment des cellules souches leucémiques au sein de la niche hématopoïétique) ; cela conduit à émettre l'hypothèse d'un contrôle du clone leucémique résiduel par le SI résultant d'un état de restauration d'immunosurveillance chez ces patients.

Nous proposons dans ce travail de thèse de déterminer la place des LT CD8 innés dans le contrôle de la LMC.

Au cours de la première partie de notre travail, nous avons étudié les LT CD8 innés au diagnostic de la LMC et chez les patients en rémission sous traitement par ITK, comparativement à des témoins sains. Les données expérimentales précédemment acquises par notre laboratoire avec un autre contingent T inné, les iNKT, nous ont conduits à postuler que

les LT CD8 innés présenteraient des défaillances numériques et/ou fonctionnelles chez les patients au diagnostic de la LMC en PC (LMC-PC) et que ces dernières seraient au moins partiellement restaurées chez les patients qui répondent de manière satisfaisante au traitement (obtention d'une RCyC (pour rémission cytogénétique complète) ou d'une MMR (pour rémission moléculaire majeure ou *major molecular remission*)).

Nous avons donc évalué le statut quantitatif et qualitatif des LT CD8 innés au diagnostic, analysé leur devenir sous traitement par ITK et recherché une association entre restauration numérique et/ou fonctionnelle de ce contingent et l'obtention d'une rémission sous ITK. Notre objectif ultime était de démontrer leur rôle d'effecteur de l'immunité anti-leucémique au cours de la LMC.

La possibilité d'arrêter le traitement par ITK de manière durable chez un grand nombre de patients représente la prochaine révolution attendue dans la LMC. En effet, une faible proportion de patients (moins de 10%) est à ce jour en situation de maintien d'une rémission prolongée après arrêt du traitement, que l'on dénomme généralement TFR (pour *treatment-free remission*). L'arrêt du traitement par ITK offre l'opportunité d'étudier l'effet net du SI sur la maladie résiduelle. A l'heure actuelle, nous disposons d'arguments indirects suggérant son implication dans le succès d'arrêt des ITK. Identifier et caractériser les cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la maladie après suspension du traitement par ITK représentent un enjeu majeur pour la communauté scientifique et les patients, des stratégies d'immuno-intervention permettant de les cibler et de les valoriser pourraient en découler. Aucune corrélation entre succès d'arrêt du traitement par ITK et le statut numérique et/ou fonctionnel des LT CD4 ou CD8 n'a pu être établie. Ainsi, en nous appuyant sur une cohorte de patients en TFR prolongée, nous avons, au cours de la seconde partie de ce travail de thèse, recherché un lien entre les paramètres numériques et fonctionnels des LT CD8 innés et le succès d'arrêt du traitement par ITK.

Enfin, dans la troisième partie et dernière partie de ce travail de thèse, nous avons poursuivi la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des LT CD8 innés en situation physiologique, émis des hypothèses sur leur mode de différenciation, et analysé leur statut dans d'autres maladies oncologiques.

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE I - IMMUNOSURVEILLANCE ET IMMUNOÉDITION DES CANCERS

I. Principe de l'immunosurveillance antitumorale et la théorie des 3 E

La découverte de l'immunité antitumorale remonte au XIXème siècle lorsque William Coley a observé chez des patients présentant un épisode infectieux aigu une régression simultanée de leurs pathologies tumorales (Coley, 1991). Il a été montré par la suite que l'injection d'inocula bactériens à des souris permettait de stimuler les défenses immunitaires de l'hôte qui, à leur tour, limitaient la progression tumorale. En 1909, Paul Ehrlich formule l'hypothèse que le SI de l'hôte peut reconnaître et détruire des cellules tumorales et prévenir dans certains cas le développement de cancers, sans toutefois avoir la capacité de le démontrer avec les moyens techniques de l'époque (Ehrlich, 1909). L'efficacité d'une vaccination avec des extraits de tumeurs contre des sarcomes permet dans les années 1950 à Gross et Foley de démontrer de manière *princeps* l'existence d'une immunité antitumorale (Foley, 1953; Gross, 1943). Ce n'est, cependant, que dans les années 1970, que Frank MacFarlane Burnet émet l'hypothèse que les effecteurs du SI sont capables de reconnaître des néo-antigènes présentés par les cellules cancéreuses et d'éradiquer celles-ci au fur et à mesure qu'elles se développent ; il formule ainsi la **théorie de l'immunosurveillance** (Burnet Fm, 1970). Le fait qu'une tumeur devienne cliniquement décelable implique par conséquent un échappement à la réponse immunitaire antitumorale. Shankaran *et al.* ont ainsi proposé en 2001 que la pression exercée par le SI s'accompagne de la sélection progressive de clones tumoraux résistants ; c'est ainsi que la théorie de l' « **édition immunologique des tumeurs** ou **immunoédition** » ou « **tumor immunoediting** » est née (Shankaran et al., 2001). Dunn *et al.* ont finalement proposé que l'immunosurveillance est un processus dynamique constitué de trois phases successives : 1) **la**

phase d'élimination au cours de laquelle les cellules tumorales sont éliminées par les cellules NK, les LT CD8 et CD4, permettant dans certains cas d'éliminer des tumeurs avant qu'elles ne deviennent décelables, 2) **la phase d'équilibre** entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales au cours de laquelle la réponse immunitaire antitumorale exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales ; le SI sculpte alors la tumeur qui devient progressivement insensible au SI. C'est la phase d'**immunoédition**, 3) **la phase d'échappement** qui aboutit à l'apparition d'une tumeur cliniquement décelable (Dunn et al., 2002).

II. Arguments expérimentaux et observationnels cliniques en faveur de la théorie de l'immunosurveillance et de l'immunoédition des cancers

II.1. Chez la Souris

A partir des années 1990, la théorie de l'immunosurveillance est étayée chez la Souris par la constitution de modèles déficients pour certaines cytokines ou effecteurs du SI : les tumeurs apparaissent beaucoup plus fréquemment chez les souris immunodéficientes que chez les souris immunocompétentes (Girardi et al., 2001; Shankaran et al., 2001; Smyth et al., 2001; Van den Broek et al., 1996). A titre d'exemple, l'équipe de Shankaran *et al.* a démontré dans un modèle de sarcomes induit chez la souris par un carcinogène, le MCA (pour méthylcholanthrène) (Shankaran et al., 2001), une incidence tumorale significativement plus élevée chez les souris immunodéficientes en LB et LT (souris RAG-2^{-/-} (gène activant la recombinaison V(D)J)), en récepteur de l'IFN- γ (souris IFNGR1^{-/-}) ou en STAT1, comparativement aux souris immunocompétentes (souris sauvages de fond génétique C57BL/6). Ces résultats démontrent ainsi de manière expérimentale la réalité du principe de l'immunosurveillance, ainsi que le rôle des effecteurs de l'immunité adaptative et de l'IFN- γ dans le cancer. Les auteurs ont ensuite réalisé des expériences de transfert secondaire de tumeurs générées par le MCA à des souris receveuses immunocompétentes et ont testé l'immunogénicité des sarcomes induits en

présence ou non d'un SI adaptatif (souris RAG-2^{-/-}). Chez les souris immunodéficientes, on assiste au développement de sarcomes induits par le MCA ayant une forte immunogénicité qui sont spontanément rejetés lorsqu'ils sont transplantés chez un animal immunocompétent. En revanche, chez les souris immunocompétentes, la pression de sélection exercée par le SI conduit au développement de sarcomes de faible immunogénicité qui résistent à la réponse antitumorale après transplantation chez des souris immunocompétentes. Ces travaux ont ainsi montré de manière *princeps* que les processus tumoraux sont modelés par la présence du SI. Le concept d'immunoédition des cancers suggère la possibilité que le SI a un impact sur le génome et le transcriptome des tumeurs au cours du processus de développement tumoral.

II.2. Chez l'Homme

Chez l'Homme, différents arguments expérimentaux et observationnels cliniques soutiennent la théorie de l'immunosurveillance tels que :

- le fait que les pathologies cancéreuses soient plus fréquentes chez les sujets immunodéprimés ; en effet, une prédisposition à la survenue de cancers a été décrite dès les années 1970 chez des sujets ayant un déficit immunitaire, qu'il soit primaire (origine génétique) ou secondaire (traitements immunosuppresseurs) (Gatti and Ra, 1971; Starzl et al., 1970). Ces cancers peuvent être viro-induits, comme par exemple le sarcome de Kaposi par le virus HHV8, ou non viro-induits comme dans le cas des patients transplantés chez lesquels la prévalence des cancers du poumon, du colon, du pancréas, et de mélanomes est augmentée par rapport à la population générale (Dunn et al., 2002).
- l'efficacité de stratégies thérapeutiques anticancéreuses visant à booster le SI par l'emploi de l'IFN- α ou de l'IL-2 dans le mélanome, ou l'allogreffe de CSH reposant sur l'effet GVL (pour *graft versus leukemia*) utilisée dans le traitement de certaines hémopathies malignes,
- la mise en évidence d'un infiltrat de cellules lymphoïdes (LT et cellules NK) au sein de certaines tumeurs. Dans de nombreux cancers, une corrélation positive entre la densité des TIL (pour lymphocytes infiltrant la tumeur) et la survie du patient a été décrite

illustrant le rôle protecteur du SI vis-à-vis des processus cancéreux (Tosolini et al., 2011).

- et enfin par l'identification par l'équipe de Thierry Boon dans les années 1990 des gènes codant des antigènes tumoraux reconnus par les LT (cf. ci-après).

Chez l'Homme, le phénomène d'immunoédition a été illustré récemment par les travaux de Swanton *et al.* (Rosenthal et al., 2019). Les auteurs ont pratiqué une analyse génomique et transcriptomique de 64 tumeurs et 164 zones tumorales de cancers bronchiques non à petites cellules traités par chirurgie. Leurs résultats montrent un lien entre la charge mutationnelle de la tumeur (nombre élevé de mutations dans les cellules tumorales) et l'importance de l'infiltration de cette dernière par les effecteurs du SI, indiquant comme chez la Souris qu'une forte immunogénicité induite par mutations génétiques facilite la mise en place d'une réponse immunitaire. De manière intéressante, le microenvironnement immunitaire varie considérablement entre les patients, mais également parfois entre différentes zones au sein de la même tumeur. Un phénomène de régulation négative de la transcription de gènes codant pour des néoantigènes susceptibles d'être présentés aux LT *via* les molécules du CMH a été mis en évidence, la perte d'expression de néo-antigènes favorisant un échappement tumoral à la destruction par le SI. Sur le plan génomique, des anomalies touchant des régions codant des néoantigènes ou des protéines impliquées dans la présentation antigénique ont été décrites. Il a aussi été mis en évidence des modifications épigénétiques à l'origine d'une inhibition de la transcription de gènes codant des néoantigènes (hyperméthylation de leur promoteur). L'ensemble de ces données montre que l'immunoédition conditionne par des mécanismes génétiques et épigénétiques l'évolution des cellules constitutives d'une tumeur.

III. Les antigènes tumoraux chez l'Homme

L'équipe de Thierry Boon à Bruxelles a démontré en 1991 l'existence d'antigènes tumoraux reconnus de manière spécifique par des LT entraînant leur prolifération et leur différenciation en CTL (pour *cytotoxic lymphocyte T*) (van der Bruggen et al., 1991). Leurs travaux réalisés à

partir de cultures mixtes de cellules de mélanome humain et de lymphocytes périphériques du même sujet ont permis d'identifier les gènes *MAGE* (pour *melanoma antigen*). Au cours de cette culture mixte, les lymphocytes capables de reconnaître les antigènes tumoraux prolifèrent et se différencient en CTL qui sont clonés, puis utilisés pour sélectionner des sous-populations de cellules tumorales dont les génomes sont ensuite comparés. Avec la même stratégie d'autres gènes codant des antigènes dits « de tumeur » ont été découverts par la suite (pour revue (Finn, 2017)). Ils codent pour des protéines qui sont dégradées et présentées sous forme de peptides à la surface de la cellule par l'intermédiaire des molécules de classe I du CMH. Un peptide est dit antigénique s'il est reconnu par l'organisme comme étranger et, immunogène si sa reconnaissance par des LT spécifiques aboutit à une réponse efficace. Il existe plusieurs catégories d'antigènes de tumeur mais aucune classification n'est véritablement satisfaisante. Ils peuvent être spécifiques des cellules tumorales ou simplement associés aux tumeurs. Lorsque l'expression d'un antigène est partagée par différents types histologiques de cancers, on parle d'antigènes « publics » (pour revue (Vigneron, 2015) (cf. **Figure 1**) :

- Ils peuvent être le produit d'un gène normalement présent dans le génome, mais qui ne s'exprime pas dans les cellules normales adultes. C'est le cas de la famille des gènes *MAGE*, *BAGE* (pour *bladder antigen*), *GAGE* (pour *gastric antigen*), *RAGE* (pour *renal antigen*) ou encore de l' α -fœtoprotéine. Aucune expression des gènes *MAGE* n'est décelable dans les tissus normaux, à l'exception des testicules et du placenta, mais 75 % des mélanomes expriment au moins un des quatre gènes *MAGE*.
- Ils peuvent être le produit de gènes normaux surexprimés ou exprimés de manière aberrante. Une seule copie du proto-oncogène *HER-2/neu* est présente dans les cellules normales, mais le gène est amplifié dans certaines cellules tumorales. La protéine *HER-2/neu*, à peine décelable en immunohistochimie dans les tissus adultes, est surexprimée dans environ 40 % des cancers du sein et de l'ovaire.
- Ils peuvent être induits par des modifications post traductionnelles telle qu'une altération de la glycosylation ; par exemple, une glycosylation anormale de la mucine

MUC1 engendre des déterminants antigéniques nouveaux dans les tumeurs mammaires, de l'ovaire ou du pancréas.

- Comme nous l'avons déjà évoqué, une mutation ponctuelle peut également conduire à une protéine anormale donnant naissance à un peptide antigénique. Des oncogènes (*ras*) ou des gènes suppresseurs (*p53*) mutés peuvent ainsi se révéler à la fois oncogéniques et antigéniques. Par exemple, dans 50 % des cancers du côlon et 90 % des adénocarcinomes pancréatiques, les mutations de *ras* codent une protéine p21ras, connue pour son antigénicité. De la même manière, la translocation (9;22) observée dans la LMC qui aboutit à la fusion des gènes *BCR* (pour *breakpoint cluster region*) et *ABL1* (*Abelson*) est responsable de l'expression d'une protéine chimérique. La portion de cette protéine qui correspond à l'endroit de la fusion BCR-ABL est antigénique.

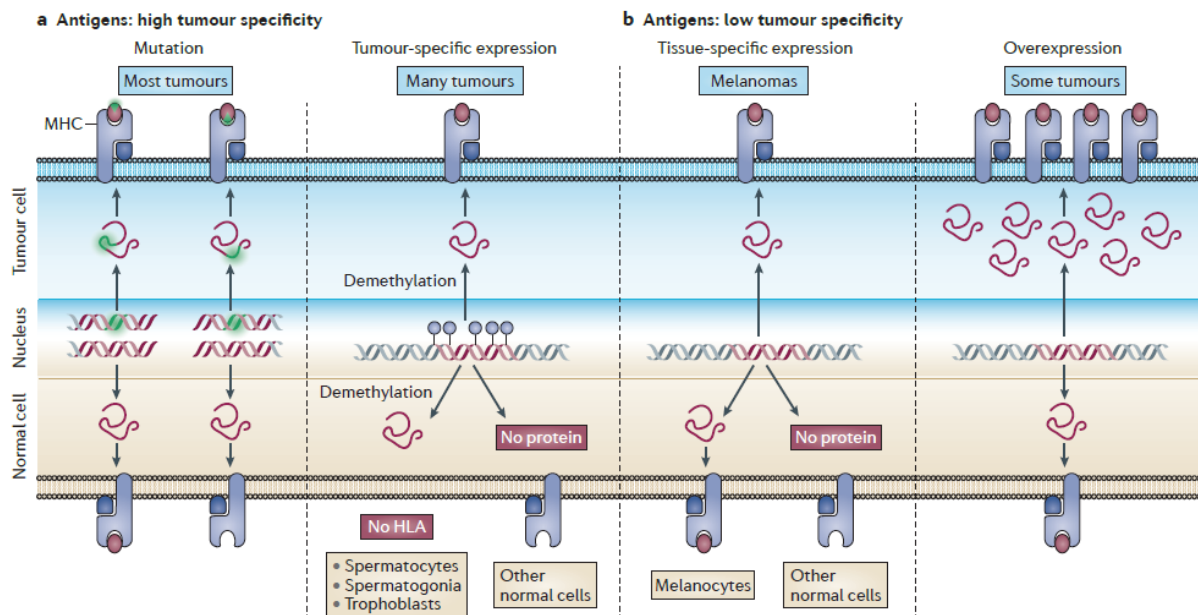


Figure 1 : Les différentes classes d'antigènes tumoraux reconnus par les LT (Coulie et al., 2014).

a. Les antigènes hautement spécifiques des cellules tumorales. Certains antigènes sont générés par mutations génétiques ponctuelles. Les gènes de type cancer « *germline* » s'expriment à la suite d'une déméthylation dans les cellules tumorales et les cellules germinales mais dans le cas des cellules germinales il n'y a pas de présentation par les molécules HLA (pour *human leucocyte antigen*). **b.** Les antigènes associés aux tumeurs (faible spécificité). Il peut s'agir de l'expression d'un antigène issu de la traduction d'un gène spécifique d'un tissu, en l'occurrence des mélanocytes. L'amplification de l'expression d'une protéine, ERBBz peut également entraîner la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale dirigée contre cette dernière. NB : seules les molécules HLA de classe I sont représentées, mais les molécules HLA de classe II peuvent également présenter des peptides antigéniques tumoraux aux LT CD4.

- Une autre catégorie est représentée par les antigènes dérivés d'agents pathogènes, notamment de certains virus comme les virus d'Epstein-Barr (EBV), de l'hépatite B ou papillomavirus. Ces derniers jouent un rôle initiateur de la cancérogenèse.

Plus récemment, il a été rapporté que certaines voies de morts cellulaires étaient plus « immunogéniques » que d'autres (Inoue and K, 2014; Yatim et al., 2015). Les DC (pour *dendritic cells* ou cellules dendritiques) une fois activées, après mort cellulaire, par des stimuli inflammatoires et les antigènes présents à la surface des débris cellulaires sont capables à leur tour d'activer les LT CD8 par mécanisme de présentation croisée ou *cross-presentation*. Ce dernier représente la capacité des DC à présenter à leur surface, dans le contexte des molécules du CMH de classe I, des antigènes captés dans le milieu extracellulaire. Yatim *et al.* ont montré que l'activation de certaines voies de signalisation au sein des cellules en voie de nécrose ou d'apoptose (RIPK1 et NF- κ B) conditionne le potentiel de présentation croisée des DC et donc de recrutement du SI adaptatif.

IV. Rôle des effecteurs de l'immunité innée dans la réponse immunitaire antitumorale

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense antitumorale. Elle est caractérisée par une réponse rapide et par une reconnaissance non spécifique. Elle comprend d'une part des facteurs :

- solubles tels que les protéines du complément et différentes cytokines. L'IFN- γ joue un rôle clé par son action antitumorale directe (stimulation de la mort cellulaire, effet antiprolifératif), ainsi que par sa capacité à potentialiser la présentation antigénique des DC en augmentant l'expression des molécules du CMH à leur surface et ainsi à activer les effecteurs de l'immunité adaptative (Ling and Lu, 2018),
- cellulaires tels que les cellules tueuses (les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les cellules NK) et les phagocytes (les macrophages et les DC qui jouent un rôle prépondérant dans l'induction de la réponse immunitaire adaptative en présentant l'antigène aux LB et LT).

IV.1. Les DC

Les DC jouent un rôle crucial et complexe dans la réponse immunitaire antitumorale. Elles ont la capacité de capturer des antigènes provenant de lysats, de fragments ou de corps

apoptotiques de cellules tumorales, de s'activer et de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Les DC matures expriment à leur surface une densité élevée de molécules de costimulation telles que CD40 et CD80/86 (famille B7). Elles vont attirer les LT vers les organes lymphoïdes secondaires à l'aide de chimiokines et vont leur présenter l'antigène (cf.

Figure 2).

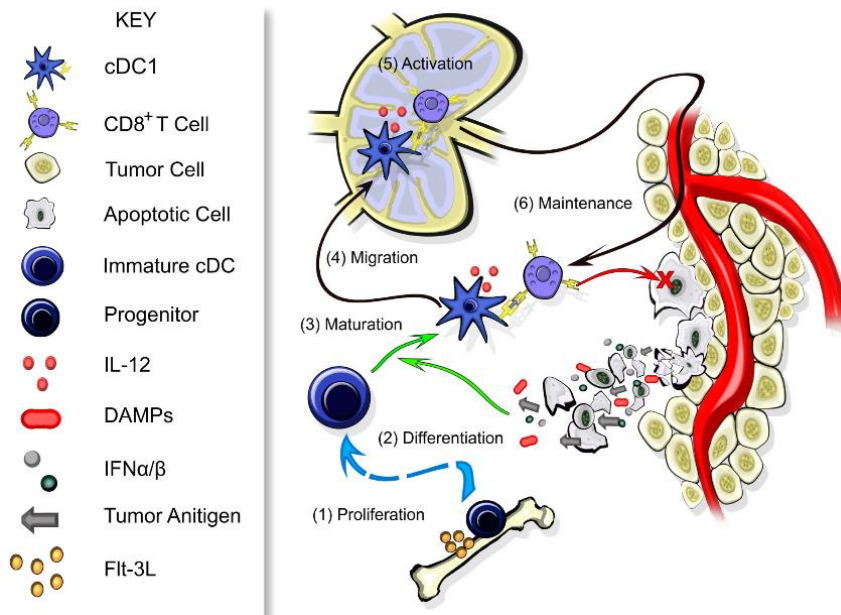


Figure 2 : Les DC et immunité antitumorale T CD8 (Gardner A and Ruffell B, 2016).

Les DC conventionnelles (ou myéloïdes) sont nécessaires à la génération d'une réponse T antitumorale. **(1)** L'expansion des progéniteurs des DC a lieu dans la moelle osseuse sous le contrôle du ligand de FLT3 (pour *FMS-related tyrosine kinase 3*). Les progéniteurs des DC se différencient en DC immatures au sein des tissus ; elles captent les antigènes mais sont incapables de stimuler les LT **(2)** l'activation et la maturation des DC dépend des DAMP (pour *damage associated molecular patterns*) libérés par les cellules nécrotiques et/ou des interférons de type I libérés par les cellules du microenvironnement tumoral. **(3)** les DC matures exprimant CCR7 migrent vers le ganglion et vont déclencher **(4)** l'activation des LT CD8 **(5)** qui migrent ensuite vers le site tumoral, et qui en fonction de la vascularisation et de l'organisation du stroma tumoral parviennent à exercer leur activité de cytolytique vis-à-vis des cellules tumorales **(6)** les DC localisées sur le site tumoral peuvent moduler la réponse antitumorale effectrice des LT en sécrétant diverses cytokines notamment l'IL-12. En conditions idéales la réponse T effectrice permet la libération de nouveaux antigènes tumoraux, de DAMP et de cytokines pro-inflammatoires, entraînant ainsi une amplification de la réponse immunitaire antitumorale.

Les LT CD4 ou CD8 reconnaissent les antigènes tumoraux présentés à la surface des DC, respectivement par les molécules du CMH de classe II et I. La plupart des cellules présentent des antigènes endogènes *via* les molécules du CMH de classe I ; la présentation *via* les molécules de classe II quant à elle est exclusivement réalisée par les CPA (pour cellules

présentatrices d'antigènes) (macrophages, LB, DC) et permet la présentation d'antigènes captés dans le milieu extracellulaire. Les DC sont les cellules spécialisées dans la présentation antigénique. Grâce au phénomène de présentation croisée, elles ont la capacité de présenter aux LT CD8 des antigènes exogènes. L'interaction du TCR avec le complexe CMH-peptide n'est pas suffisante pour déclencher l'activation des LT CD8, ce premier signal devant être accompagné de deux autres signaux : l'interaction de différentes molécules de costimulation exprimées à la surface des DC matures et des LT (= 2^{ème} signal) et la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (=3^{ème} signal) (Summers deLuca and Gommerman JI, 2012).

Le niveau d'expression des molécules de costimulation à la surface des DC dépend de leur état de maturation. La maturation des DC est favorisée par :

- l'engagement de CD40 avec CD40L exprimés par les LT activés. La signalisation *via* CD40 entraîne une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II et de celle des molécules de costimulation CD80/86 ainsi qu'une sécrétion d'IL-12 responsable de la polarisation des LT CD4 vers un profil de type T *helper* (Th) 1 (sécrétion d'IFN- γ) (Ma and Clark, 2009).
- la présence des signaux DAMP (pour *damage associated molecular pattern*) qui sont reconnus par des récepteurs spécifiques comme les récepteurs Toll-like (pour *toll-like receptors*) ou les récepteurs des protéines de choc thermique (pour *heat shock protein*) (Bonifaz et al., 2002; Dudek et al., 2013; Gabrilovich, 2004; Harding et al., 1992).

Dans des conditions de microenvironnement pro-inflammatoire et de maturation optimale, les DC sont capables d'activer de manière efficace des LT CD8 naïfs. En revanche, si l'engagement des molécules de costimulation ou la densité de molécules du CMH à leur surface font défaut, les DC sont à l'origine d'un état de tolérance vis-à-vis des cellules tumorales (DC tolérogènes). En cas d'anomalies de différenciation des DC, on assiste à une accumulation de DC immatures au détriment des cellules matures ; ce phénomène a été décrit dans de nombreux cancers chez l'Homme (Almand et al., 2000; Della Bella et al., 2003; Hoffmann, Thomas K; Labidy-Galy et al.; Mohty et al., 2001).

IV.2. Les cellules NK

Les cellules NK ont été historiquement classées dans la catégorie des effecteurs du SI inné (Cerwenka and Lanier, 2001). Plus récemment, elles ont été rattachées à la catégorie émergente des ILC (pour *innate lymphoid cells*) qui partagent de nombreuses caractéristiques fonctionnelles avec les LT CD4 mais qui se distinguent, entre autres, par l'absence de réarrangement des récepteurs à l'antigène dépendant du gène RAG (Artis D and Spits H, 2015). Les cellules NK représentent 5 à 15% des lymphocytes sanguins circulants chez l'adulte sain et peuvent être décelées à des fréquences variables dans les tissus périphériques, tels que le poumon et le foie (Cerwenka and Lanier, 2001). Chez l'homme, on distingue en périphérie deux sous populations :

- les cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ caractérisées par leur capacité de production de grande quantité de cytokines,
- et les cellules NK CD56^{dim} CD16⁺ caractérisées par un fort potentiel cytotoxique.

Les cellules NK constituent une première ligne de défense contre les cellules infectées ou tumorales. La distinction entre cellules saines et cellules transformées se fait *via* l'intégration de signaux en provenance des cellules cibles et reçus par les cellules NK par l'intermédiaire de leurs récepteurs de surface qui peuvent être activateurs ou inhibiteurs.

Les récepteurs activateurs sont : CD16, NKG2D, les NCR (pour *natural cytotox receptors*), les KIR activateurs (par exemple KIR2DS, KIR3DS), CD226 (ou DNAM-1) et les récepteurs de la famille SLAM (pour *signaling lymphocytic activation molecule*). Le récepteur NKG2D possède comme ligand des protéines de stress, comme par exemple MICA (pour *MHC class I polypeptide-related sequence A*). Les KIR reconnaissent les molécules de classe I du CMH à la surface des cellules cibles comme évoqué ci-avant. Certains auteurs ont montré que le niveau d'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKG2D par les cellules NK localisées dans les ganglions métastatiques est inversement corrélé au développement de métastases à distance (Messaoudene M et al., 2014).

Les récepteurs inhibiteurs sont : NKG2A, les KIR inhibiteurs, TIGIT (pour *T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains*), CD96, PD-1 (pour *programmed cell death 1*), CTLA-4 (pour *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*), LAG-3 (pour *lymphocyte-activation gene 3*), VISTA (pour *V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation*) et TIM-3 (pour *T-cell immunoglobulin and mucin domain-3*) (Pahl J and Cerwenka A, 2017).

En dehors de cette balance de signaux activateurs et inhibiteurs, la puissance de la réponse effectrice des NK dépend également de leur « *priming* », c'est-à-dire de leur stimulation par des cytokines comme l'IL-15, l'IL-12, l'IL-18, l'IL-21 ou l'IL-13 ou par la reconnaissance de séquences propres aux microorganismes dénommées PAMP (pour *pathogen associated molecular patterns*).

Il existe deux modes d'activation des cellules NK :

- le « *missing-self recognition* » : la diminution ou la perte d'expression des molécules du CMH de classe I par les cellules infectées ou tumorales entraînent leur destruction (Vivier E et al., 2008),
- l'« *induced-self recognition* » : l'expression de molécules de stress par les cellules tumorales et leur engagement à des récepteurs activateurs présents à la surface des cellules NK entraînent la destruction des cellules tumorales. A titre d'exemple, les molécules MICA et MICB exprimées par de nombreuses cellules tumorales sont des ligands du récepteur activateur NKG2D.

Après activation (cf. **Figure 3**), les cellules NK libèrent, au niveau de la synapse immunologique, par exocytose de leurs granules cytoplasmiques préformés, des protéines cytotoxiques (perforine et granzymes) (Krzewski and Strominger, 2008). L'apoptose des cellules cibles peut être également induites *via* l'expression du ligand de FAS (Fas-L) et de TRAIL (pour *tumor necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand*) exprimés par les cellules NK. Ces dernières ont également la capacité de détruire les cellules tumorales *via* leur expression du récepteur FcγRIIIa/CD16 responsable de la cytotoxicité dépendante des

anticorps (AC) (ou ADCC pour *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Dans des conditions optimales pro-inflammatoires, les cytokines activatrices (IL-15, IL-18, IFN- α , IL-2) produites par les DC et les LT CD4 amplifient le potentiel cytotoxique des cellules NK. Les cellules NK exercent, de plus, un rôle pivot entre immunité innée et adaptative *via* leur sécrétion d'IFN- γ qui potentialise l'expression des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules stressées, infectées ou tumorales et de classe II à la surface des monocytes, macrophages et DC (Vivier E et al., 2008).

Les cellules NK jouent ainsi un rôle important dans l'immunosurveillance antitumorale. Leur implication dans le rejet de tumeurs hématopoïétiques transplantées ou chimio-induites a été démontrée dans de nombreux modèles murins, dans lesquels les cellules NK préviennent la croissance tumorale et participent à la mise en place des réponses immunitaires innées et adaptatives (Cerwenka and Lanier, 2001; Diefenbach A et al., 2001; Kelly Jm et al., 2002). Chez l'Homme, une association entre une activité cytolytique NK détériorée et une augmentation de l'incidence des cancers a été décrite (Imai K et al., 2000). De plus, de nombreuses thérapeutiques employées chez l'Homme sont basées sur le potentiel antitumoral des cellules NK tels que l'effet GVL de l'allogreffe de CSH (Ruggeri L et al., 2002), l'activité des AC monoclonaux tels que le rituximab (anti-CD20), le cetuximab (anti-EGFR pour *epidermal growth factor receptor*), ou le trastuzumab (anti-HER2/neu) (Kirkwood et al., 2012). Plusieurs travaux ont rapporté une association entre la réponse clinique à une immunothérapie basée sur un AC monoclonal et le potentiel d'activation, de cytotoxicité et d'infiltration de la tumeur par les cellules NK dans différents types de cancer (Arnould L et al., 2006; Maréchal R et al., 2010; Veeramani S et al., 2011). Les cellules NK exercent des fonctions antitumorales directes et contribuent à la mise en place de l'immunité antitumorale des LT. Il a été montré dans des modèles murins qu'ils stimulent le recrutement de DC et de LT CD4 T-Bet⁺ sur le site tumoral, la production de TNF- α (pour *tumour necrosis factor*) et d'IFN- γ par les TIL,

l'acquisition d'un phénotype mémoire par les LT effecteurs, tandis qu'ils répriment l'expression du récepteur inhibiteur PD-1 par les TIL CD8 (Bi and Tian, 2019). Barry *et al.* ont rapporté chez l'Homme une association entre la fréquence des cellules NK infiltrant la tumeur et la réponse clinique ainsi que la survie globale à une immunothérapie ciblant PD-1 (Barry Kc et al., 2018).

Dans le contexte d'échappement tumoral (cf. **Figure 3**), leur activité est inhibée par un excès de signaux inhibiteurs en provenance des cellules tumorales. Les LTreg (pour lymphocytes T régulateurs), les cellules myéloïdes suppressives (pour *myeloid-derived suppressor cells* ou MDSC) et les macrophages de type 2 sécrètent des facteurs immunosuppresseurs (TGF- β (pour *transforming growth factor*)), IL-10, PGE2 (pour *prostaglandin E2*), VEGF (pour *vascular endothelial growth factor*), NOS (pour *nitric oxide*) et ROS (pour *reactive oxygen species*) responsables de la mise en place d'un microenvironnement qui réprime la réponse immunitaire antitumorale effectrice des cellules NK. Les cellules cancéreuses ont également la capacité d'excréter des ligands activateurs sous forme soluble, qui leur permettent de détourner l'activité cytotoxique des cellules NK (Pahl J and Cerwenka A, 2017).

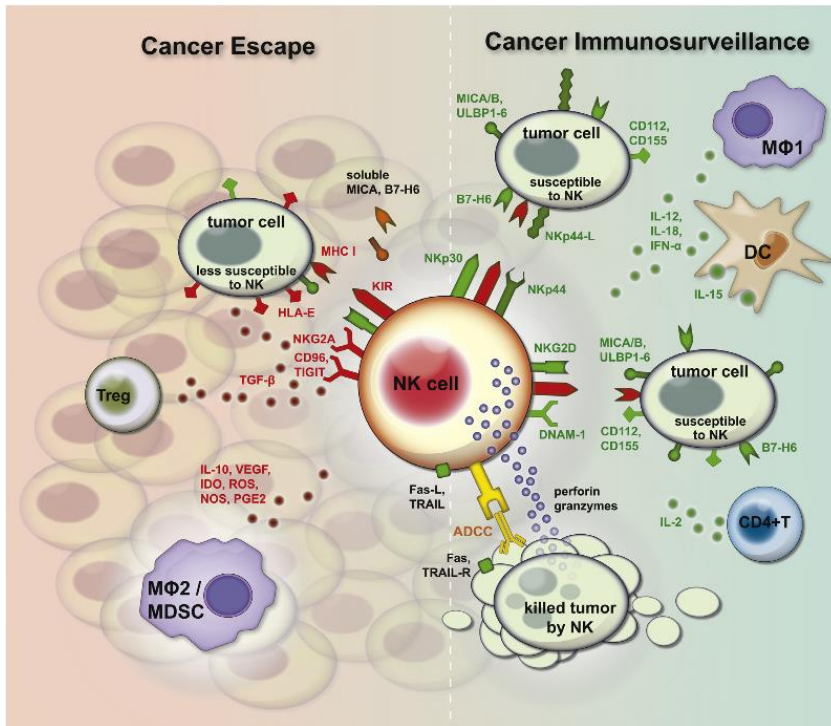


Figure 3 : Régulation de la cytotoxicité des cellules NK en situation d'immunosurveillance antitumorale et d'échappement tumoral (Pahl J and Cerwenka A, 2017).

Les récepteurs de cellules NK activateurs (vert) ou inhibiteurs (rouge) interagissent avec des ligands activateurs (vert) ou inhibiteurs (rouge) à la surface des cellules cancéreuses. En présence d'un excédent de signaux activateurs, les cellules NK éradiquent leur cible *via* **i)** la libération de perforine/granzyme, **ii)** l'expression de Fas-L et de TRAIL à leur surface, **iii)** par ADCC médiée par leur récepteur CD16/FcγR3a. Dans le contexte d'un microenvironnement pro-inflammatoire, les cytokines activateuses IL-15, IL-18, IFN-α ou IL-2 produites par les DC et les LT CD4 stimulent la cytotoxicité des cellules NK. Dans le microenvironnement tumoral, l'activité des cellules NK est inhibée par un excédent de ligands inhibiteurs exprimés par les cellules tumorales. La constitution d'un milieu immunosuppresseur est basée sur la libération de TGF-β, d'IL-10, de PGE2, de VEGF, de NOS et de ROS produits par les LTreg, les MDSC, les MΦ2 (pour macrophages M2). La sécrétion par les cellules tumorales de ligands activateurs solubles détourne l'activation des cellules NK et favorise l'échappement tumoral.

V. Priming et activation des LT au cours de la réponse immunitaire antitumorale

V.1. Introduction

Les LT spécifiques d'antigènes tumoraux sont des acteurs clés de l'immunité antitumorale. La réponse immunitaire adaptative se développe plus lentement (en moyenne une semaine) que la réponse immunitaire innée mais se caractérise par une reconnaissance et une réponse spécifique à l'antigène et par une mémoire immunologique.

Après leur interaction avec les DC et leur activation au niveau des zones T des ganglions, les LT CD8 spécifiques de l'antigène se différencient en CTL qui circulent dans l'organisme jusqu'au site tumoral. Ils sont attirés vers le tissu transformé *via* la libération de chimiokines pro-inflammatoires. Il est important que les CTL puissent infiltrer la tumeur pour entraîner la lyse des cellules tumorales qui repose sur deux mécanismes :

- la voie perforine-granzymes (dépendante du calcium) responsable d'une mort par apoptose *via* l'activation de la voie des caspases,
- la voie Fas/Fas-L (indépendante du calcium) responsable de la formation d'un complexe nommé DISC (pour *death inducing signaling complex*), aboutissant *in fine* à l'apoptose par libération du Cytochrome-C par la mitochondrie.

Les LT CD8 effecteurs produisent aussi différentes cytokines après activation : l'IFN- γ , le TNF- α , et l'IL-2.

La reconnaissance spécifique par un LT CD4 naïf *via* son TCR d'un complexe peptide-CMH de classe II entraîne sous l'effet de l'IL-12 la génération de lymphocytes Th1 effecteurs. Le lymphocyte Th1 activé sécrète de nombreuses cytokines, notamment de l'IL-2, qui contribuent à la prolifération et la différenciation des LT CD8. Les lymphocytes Th1 activés favorisent aussi la maturation des CPA *via* l'engagement de CD40L et sécrètent de l'IFN- γ qui contribue au maintien d'un environnement pro-inflammatoire. En contexte cytokinique pro-inflammatoire, les DC matures sont capables d'activer directement des LT CD8 naïfs. Il a été rapporté dans le cas du mélanome une activité cytotoxique des LT CD4 vis-à-vis des cellules tumorales exprimant les molécules du CMH de classe II (expression secondaire à une exposition à l'IFN- γ) (Kreiter et al., 2015).

V.2. Rôle essentiel des LT mémoires dans l'immunité antitumorale

En présence des lymphocytes Th, les LT CD8 se différencient en LT mémoires de type mémoires effecteurs et mémoires centraux. En fonction de leur stade de maturation, on

distingue plusieurs populations de LT CD8 dont les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles sont différentes :

- les LT CD8 naïfs CD45RA⁺ (isoforme de la phosphatase membranaire CD45 régulant la signalisation en aval du TCR), CCR7⁺ (récepteur aux chimiokines orientant vers les organes lymphoïdes secondaires) et CD62L⁺ (molécule d'adhésion de type L-sélectine responsable de l'adressage au niveau des veines endothéliales hautes),
- les LT effecteurs CD45RA⁺, caractérisés par la génération des granules lytiques remplis de perforine et granzymes, la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α , et leur phénotype CCR7⁻ CD62L⁻ (perte de la capacité de migration vers les organes lymphoïdes secondaires),
- les LT mémoires effecteurs (CD45RA⁻, CD45RO⁺, CCR7⁻, CD62L⁻), caractérisés par des propriétés voisines des LT effecteurs mais possédant une durée de vie plus longue (prolifération homéostatique). Localisés dans la rate, le sang et les tissus non lymphoïdes (peau, muqueuses), ils répondent très rapidement (en moyenne un à deux jours) à l'occasion d'une nouvelle rencontre de l'antigène,
- les LT mémoire centraux (CD45RA⁻, CD45RO⁺, CCR7⁺, CD62L⁺), de très longue durée de vie constituant un pool de réserve de cellules mémoires. Leur prolifération homéostatique dépend de l'IL-7, de l'IL-15 et des lymphocytes Th.

Après administration d'une thérapie antitumorale curative, il a été décrit qu'une souris donnée pouvait devenir réfractaire à un rechallenge avec la même tumeur. Ce résultat suggère le développement d'une réponse mémoire vis-à-vis des antigènes tumoraux.

Le « *priming* » des cellules T naïves a lieu dans le territoire de drainage lymphatique correspondant à la localisation carcinologique ou dans les structures lymphoïdes tertiaires en cas de tumeurs solides (Dieu-Nosjean Mc et al., 2016). Après sélection et amplification clonale, les LT CD8 spécifiques de différents épitopes antigéniques se différencient en LT cytotoxiques effecteurs et mémoires. Des modèles tumoraux expérimentaux montrent que les TIL CD4 et CD8 possèdent un phénotype mémoire, soit associé à un phénotype activé (HLA-DR, Ki67), soit à un phénotype « *exhausted* » caractérisé par l'expression des récepteurs de costimulation négative PD-1, TIM-3, ou LAG-3. L'exposition prolongée à un antigène entraîne l'expression

de ces récepteurs régulateurs inhibiteurs qui répriment les fonctions effectrices des LT. Récemment, dans des modèles murins d'infection virale chronique (Angelosanto Jm et al., 2012; Michael A. Paley et al., 2012) et de tumeurs générées par des inhibiteurs de la voie des MAP (pour *mitogen-activated protein*) dénommés MEKi (pour *inhibitors of the MAP kinase pathway*), certains auteurs ont suggéré l'existence d'une première étape de différenciation dénommée « *short term memory cell* » (T-Bet⁺ Eomes^{low} PD-1^{low}) qui précéderait la prolifération et la différenciation en LT effecteurs (T-bet⁺ Eomes⁺) et en LT mémoires (mémoires effectrices et mémoire centrales) (cf. **Figure 4**). En cas d'exposition prolongée à l'antigène, deux types de contingents de LT effecteurs en exhaustion ont été observés :

- les « *freshly exhausted effector T cells* » qui expriment PD-1 à un niveau intermédiaire (PD-1^{med}) ; il existe une possibilité de réactivation de cette population en cas d'administration d'une immunothérapie avec un AC bloquant l'interaction PD-1/PD-L1 (pour *programmed death-ligand 1*),
- les « *hyperexhausted effector T cells* » qui expriment fortement PD-1 (PD-1^{high}) ainsi que d'autres marqueurs d'exhaustion tels que LAG-3, TIM-3, ou TIGIT ; cet état ne peut être reversé par l'administration d'une immunothérapie avec un AC bloquant l'interaction PD-1/PD-L1 (cf. **Figure 4**).

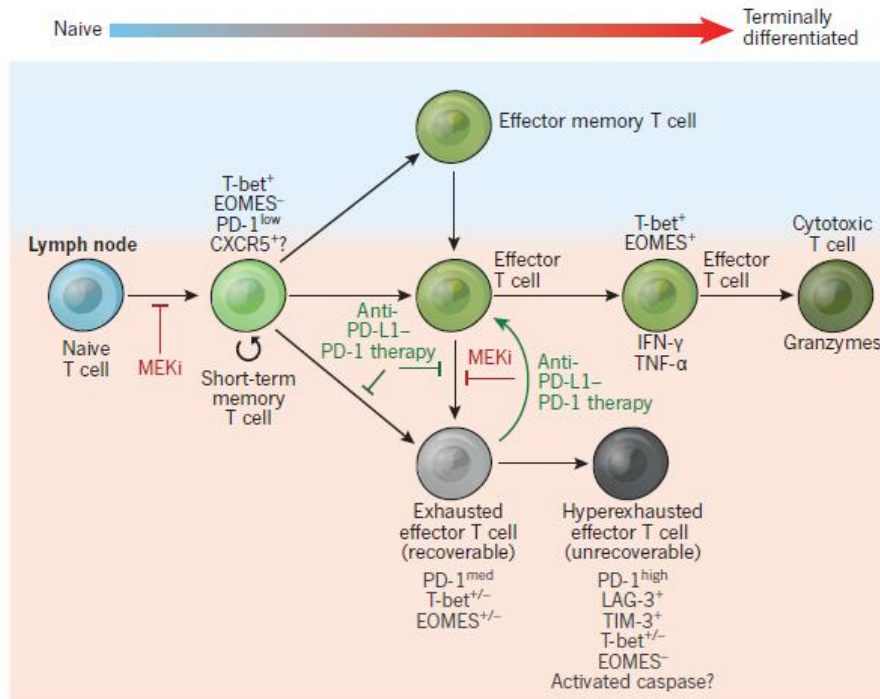


Figure 4 : Les stades de différenciation des LT CD8 au cours de la réponse immunitaire antitumorale (Chen and Mellman, 2017).

Dans ce modèle, les tumeurs sont générées par un inhibiteur de la voie des MAP (« *mitogen-activated protein* ») dénommé MEKi (pour *inhibitor of the MAP kinase pathway*).

Chez l’Homme, différents travaux ont également montré que les TIL possédaient un phénotype de type mémoire (Fang L et al., 2013; Gros et al., 2014; Wang Qj et al., 2012; ZHOU et al., 2011). Parmi ces études, celle de Gros *et al.* a documenté qu’une proportion élevée de TIL de type effecteur mémoire CD62L⁻CD45RO⁺ exprimaient fortement PD-1 ainsi que d’autres marqueurs d’activation et d’exhaustion.

VI. Mécanismes d’échappement des cancers à la réponse immunitaire antitumorale

De nombreux mécanismes sont à l’origine d’une résistance des cellules tumorales vis-à-vis du SI, tels que (pour revue (Zitvogel et al., 2006)) :

- la réduction de l’expression des molécules du CMH de classe I par les cellules tumorales ou le défaut d’apprêtement des antigènes tumoraux (mutations des gènes du CMH-I, des transporteurs TAP (pour *transporter associated with antigen processing*), ou de certaines sous-unités du protéasome) (cf. **Figure 5**),

- la faible immunogénicité des antigènes tumoraux assimilés à des antigènes du soi,
- le développement de mécanismes permettant d'échapper à la lyse par les CTL, par exemple, par diminution d'expression ou mutations des récepteurs médiant la mort cellulaire, par méthylation ou mutations du gène codant pour la caspase-8, par hyperpression de FLIP (pour *caspase-8(FLICE)-like inhibitory protein*), ou encore par l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices telle que de PD-L1 par les cellules tumorales (cf. **Figure 5**),
- la promotion d'un environnement immunosuppresseur comprenant la production locale de l'enzyme IDO (pour *indoleamine 2,3-dioxygenase*) qui catabolise le tryptophane et bloque ainsi la prolifération des LT CD8, l'expression par les cellules tumorales du FAS-L entraînant la lyse des CTL antitumoraux, la sécrétion dans le microenvironnement tumoral de différents facteurs tels que VEGF, IL-6, IL-10 et TGF- β qui bloquent la différenciation, la maturation et les fonctions des DC. Les DC peuvent alors dans ce contexte exercer des propriétés immunosuppresseuses et favoriser la différenciation des LT CD4 en LTreg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺. D'autres contingents cellulaires, tels que les macrophages M2 et les MDSC, peuvent contribuer à l'inhiber la réponse antitumorale. Leur production de TGF- β et d'IL-10 favorise une polarisation des LT CD4 en Th2 sécréteurs de cytokines anti-inflammatoires.

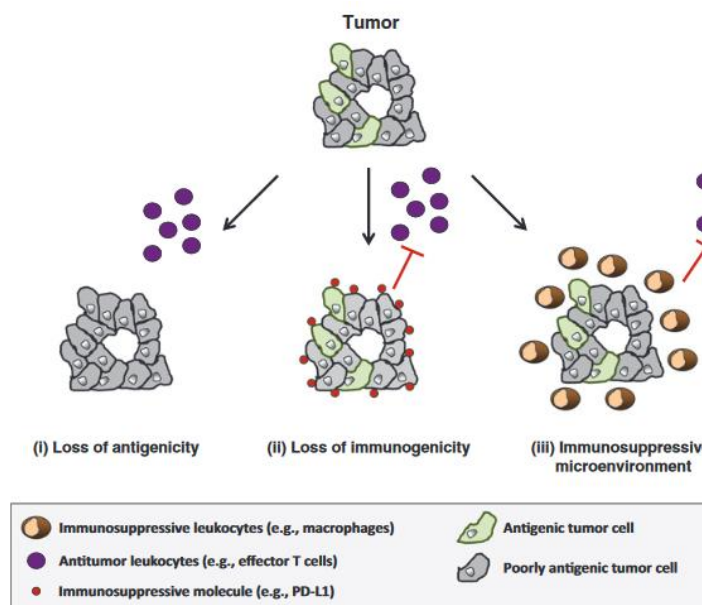


Figure 5 : Mécanismes d'échappement des tumeurs au SI (Beatty GI and Gladney WI, 2015).

Les tumeurs cliniquement apparentes développent des mécanismes leur permettant d'échapper au contrôle du SI. Durant ce processus, les cellules cancéreuses peuvent être sélectionnées par : **(i)** perte

d'antigénicité, **(ii)** perte d'immunogénicité, **(iii)** en orchestrant la mise en place d'un environnement immunosuppresseur.

Les cellules tumorales résistantes vont être progressivement sélectionnées. Comme évoqué précédemment un épuisement clonal par stimulation antigénique prolongée est également responsable d'une anergie des LT effecteurs.

En examinant les biopsies tumorales de patients naïfs de traitement, on distingue schématiquement trois profils immunitaires prédictifs de la réponse à une immunothérapie ciblant la voie PD-1/PD-L1 : « *immune-inflamed* », « *immune-excluded* », et « *immune-desert* ».

- Le phénotype « *immune inflamed* » est caractérisé par une infiltration par des LT CD4 et CD8 à proximité des cellules tumorales, et l'expression d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires et effectrices par les LT CD4 et CD8 attestant de la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale,
- Le phénotype « *immune-excluded* » est caractérisé par la présence de contingents cellulaires du SI sans pénétration au sein du parenchyme tumoral, l'infiltrat restant localisé dans le stroma tumoral.
- Le phénotype « *immune-desert* » est caractérisé par une quasi-absence de CTL reflétant l'absence probable de réponse immunitaire antitumorale pré-existante

Les phénotypes « *immune-excluded* » et « *immune-desert* » peuvent être considérés comme des tumeurs dites « non inflammées ».

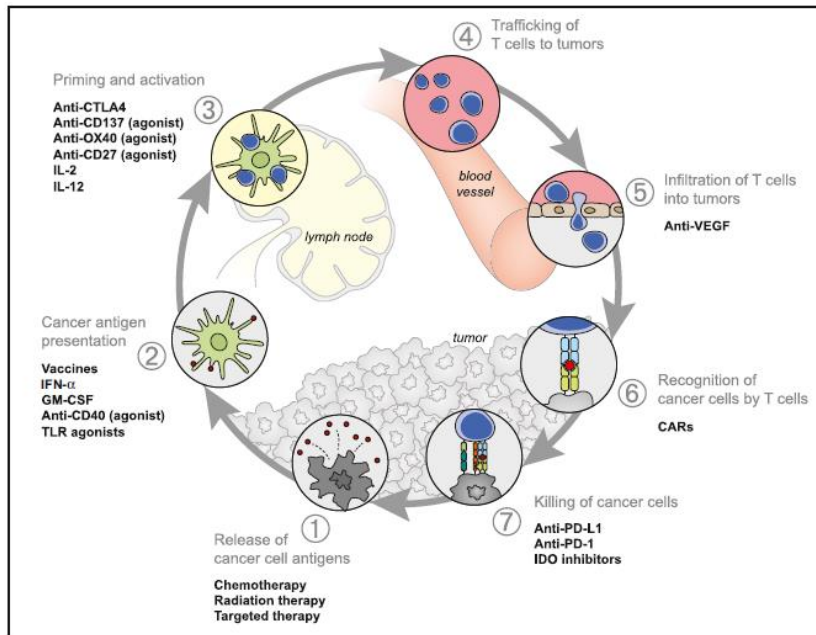


Figure 6 : Les stratégies thérapeutiques pouvant influencer sur le cycle de l'immunité antitumorale (Chen Ds and Mellman I, 2013).

La figure illustre des exemples de thérapeutiques ciblant sur les différentes étapes du « cycle » de l'immunité antitumorale. Les protocoles de vaccinations agissent sur le stade de la présentation antigénique aux cellules T (étape 2), les thérapies anti-CTLA-4 influent sur le « *priming* » et l'activation des LT (étape 3), les molécules anti-PD-1/PD-L1 favorisent la phase effectrice cytolytique des LT (étape 7). Les traitements antitumoraux conventionnels, tels que la chimiothérapie, la radiothérapie ou les thérapies ciblées, peuvent promouvoir l'apparition de cibles antigéniques exprimées par les cellules cancéreuses (relargage d'antigènes tumoraux = étape 1). Les inhibiteurs du VEGF peuvent faciliter l'infiltration des LT au contact de la tumeur (étape 5). GM-CSF : *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* ; CAR : *chimeric antigen receptor*.

A chaque étape du « cycle » de l'immunité antitumorale (cf. **Figure 6**) entrent en compétition des facteurs stimulateurs *versus* inhibiteurs. La chimiothérapie, la radiothérapie et les thérapies ciblées peuvent favoriser la libération d'antigènes tumoraux (étape 1). Les inhibiteurs du VEGF peuvent faciliter l'infiltration de la tumeur par les LT (étape 5). C'est à partir des différents points de contrôle de chaque étape que différentes stratégies d'immunothérapies ont été développées : les protocoles de vaccinations agissent sur la présentation antigénique (étape 1), les anti-CTLA-4 agissent au niveau du « *priming* » des LT (étape 3) tandis que les AC ciblant la voie PD-1/PD-L1 agissent au niveau de la réponse effectrice (étape 7). Il existe une régulation spatio-temporelle des molécules de costimulation.

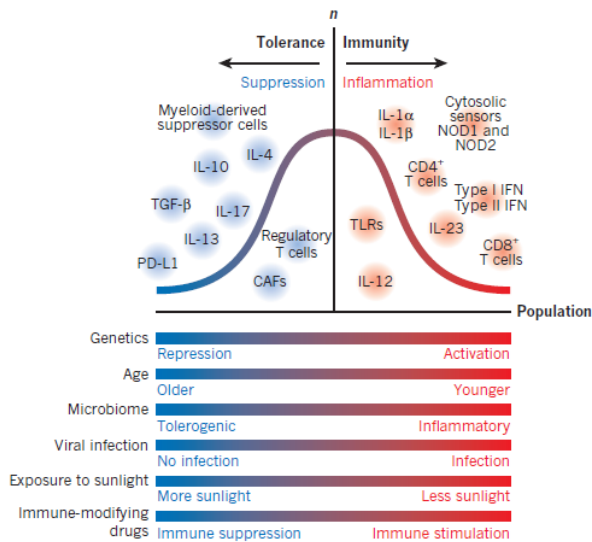


Figure 7 : Les multiples facteurs influençant la mise en place d'une immunité protectrice *versus* un état de tolérance du SI au cours des cancers (Chen and Mellman, 2017).

L'immunité antitumorale est influencée par de multiples facteurs cellulaires et moléculaires dont agissent pour promouvoir une réponse effectrice T (en bleu), tandis que d'autres favorisent la mise en place d'un état de tolérance (en rouge). Le développement d'une tumeur de phénotype plus ou moins inflammé résulte de l'intégration d'un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques. CAF : *cancer-associated fibroblasts* ; TLR : *toll-like receptor*.

Selon Chen *et al.*, en dehors des propriétés intrinsèques liées à la tumeur et à la réponse immunitaire mise en place, entrent également en jeu dans le processus de défense antitumoral des facteurs liés à l'hôte tels que son âge, ses caractéristiques génétiques, son microbiote intestinal, ses antécédents infectieux, et son exposition à des facteurs exogènes tels que des drogues immunomodulatrices/immunosuppressives (cf. **Figure 7**) (Chen and Mellman, 2017).

Concernant les effecteurs du SI, d'autres populations cellulaires impliquées dans l'immunité anti-cancéreuse ont été décrites et se trouvent à l'interface entre immunité innée et adaptative : les LT innés tels que les NKT et les LT- $\gamma\delta$. Nous allons à présent nous focaliser sur leur description.

PARTIE II - LES LYMPHOCYTES T NON CONVENTIONNELS

I. Introduction

Il a été décrit au cours de ces trente dernières années des populations de LT dits non conventionnels ou innés. Ils possèdent comme les LT conventionnels un TCR issu du réarrangement des gènes codant les domaines V, D, J des chaînes α/β ou γ/δ du TCR et sont dotés de fonctions innées : délai de réponse court (cf. **Figure 8**) sans rencontre préalable d'un antigène étranger, capacité de production de cytokines et de fonction cytotoxique pouvant être mises en jeu indépendamment d'une stimulation *via* leur TCR. Ils sont capables, à l'instar des cellules NK, de répondre à des *stimuli* pro-inflammatoires tels que les combinaisons d'IL-12, d'IL-18 et d'interférons de type I tel que l'IFN- α .

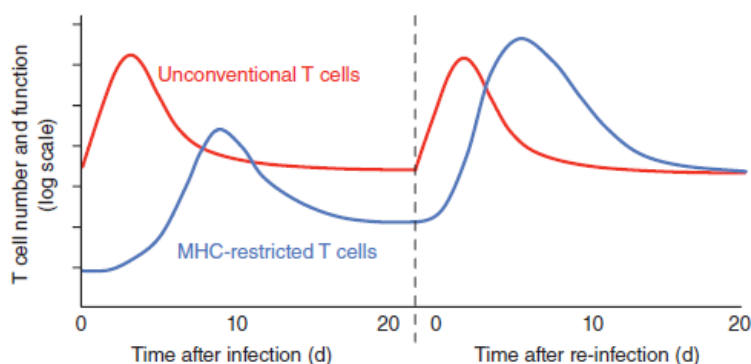


Figure 8 : Délai de réponse primaire et secondaire à une stimulation infectieuse des LT conventionnels versus non conventionnels (Godfrey et al., 2015).

La partie droite du graphique représente la réponse primaire à l'infection et la partie gauche la réponse à l'occasion d'une deuxième stimulation (réponse mémoire).

Ces populations de LT non conventionnels TCR- $\alpha\beta$ ou TCR- $\gamma\delta$ se distinguent également des LT conventionnels par les caractéristiques suivantes :

- une reconnaissance antigénique non restreinte pas les molécules du CMH classique ; ils reconnaissent des molécules présentatrices d'antigènes non polymorphiques codés par des gènes situés dans le locus des molécules du CMH (HLA-E, HFE, H2-M3 et H2-Q9) ou en dehors de ce dernier (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d et MR1).

- une reconnaissance possible d'antigènes de nature non peptidique,
- une proportion plus importante de LT susceptibles de répondre à un antigène donné chez un individu naïf que celle des LT conventionnels (cf. **Figure 9**),
- une diversité de répertoire TCR plus restreinte, pouvant dans certains cas correspondre à répertoire invariant ou semi-invariant,
- une localisation préférentielle en dehors des tissus lymphoïdes.

Table 1 Characteristics of MHC-restricted as compared to unconventional T cell responses

	MHC-restricted T cells	Unconventional T cells
Precursor frequency	Low (~1–10 per million)	Higher (~10–2 × 10 ⁶ per million)
Time to effector function <i>in vivo</i>	Days to weeks	Hours to days
Memory response	Yes (highly durable)	Controversial
Antigen-presenting molecule polymorphism	Very high	Low (functionally monomorphic)
Inter-individual TCR diversity	Very high	Varies for each subset (Species-wide TCR patterns known)
Population response to antigen	Private (individuals respond differently)	Public (most individuals in a species typically respond similarly)

In general, the key differences in the patterns of MHC-restricted and unconventional T cells relate to the initial number of antigen-specific populations, the timing of the response, the role of memory T cells and the extent to which individuals in an outbred population respond to the same kinds of antigens.

Figure 9 : Caractéristiques des LT conventionnels (« MHC-restricted T cells ») versus celles des LT non conventionnels (Godfrey et al., 2015).

Les points clés qui différencient les LT conventionnels des LT non conventionnels sont : la richesse numérique à l'état basal en cellules spécifiques de l'antigène, le délai de réponse, et le type de réponse mise en place selon les individus vis-à-vis d'un antigène donné.

Les populations T non conventionnelles ou innées exercent des fonctions critiques dans l'initiation des réponses immunitaires en jouant un rôle protecteur avant que l'immunité adaptative soit établie. Ces dernières peuvent être divisées en sous-groupes en fonction de leurs molécules de restriction : les LT- $\gamma\delta$, les NKT, les MAIT, les LT restreints par les molécules du CMH de classe Ib et les LT restreints par les molécules CD1a, b et c (Godfrey et al., 2018) (cf. **Figure 10**). Les LT innés sont impliqués dans l'immunité anti-infectieuse et antitumorale mais également dans l'homéostasie et les mécanismes de réparation tissulaire. A titre d'exemple, les iNKT et les LT- $\gamma\delta$ jouent un rôle non redondant dans la biologie du tissu adipeux au sein duquel ils exercent une activité anti-inflammatoire et participent aux mécanismes de thermorégulation et à l'équilibre métabolique de l'organisme (LaMarche et al., 2018).

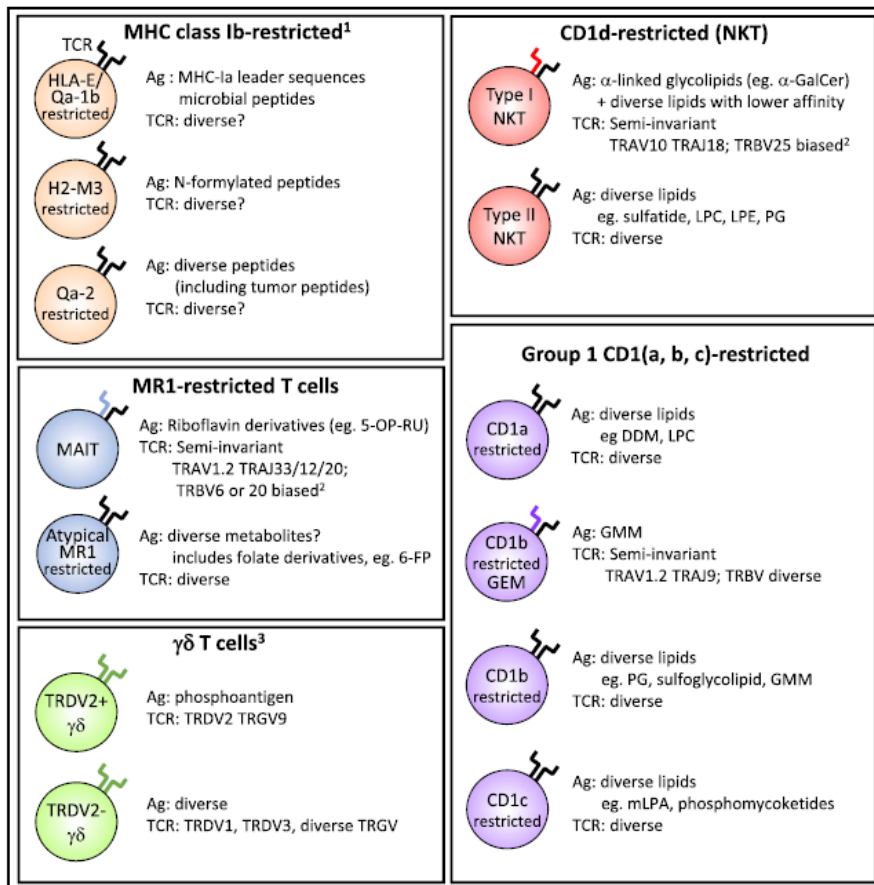


Figure 10 : Les différentes populations de LT innés en fonction de leurs molécules de restriction (Godfrey et al., 2018).

1, « H2-M3 et Qa-2 restricted T-cells » sont identifiés chez la souris ; 2, séquences TCR humaines ; 3, illustration des LT- $\gamma\delta$ humains.

II. Le gradient d'« *innateness* » des LT

L'équipe de Gutierrez-Arcelys a récemment mené des travaux visant à décrypter les caractéristiques transcriptomiques conférant aux cellules iNKT, MAIT, et LT- $\gamma\delta$ (V δ 1 et V δ 2) leurs fonctions de type « *innate* » (Gutierrez-Arcelus M et al., 2019). Les populations LT innées représentent environ 10 à 20% des LT chez l'Homme (cf. **Figure 11a**) et sont capables à l'instar des cellules NK de produire de grande quantité d'IFN- γ en réponse à une stimulation indépendante du TCR du type de celle constituée par la combinaison de cytokines pro-inflammatoires IL-12+IL-18 +/- IFN- α (cf. **Figure 11b**).

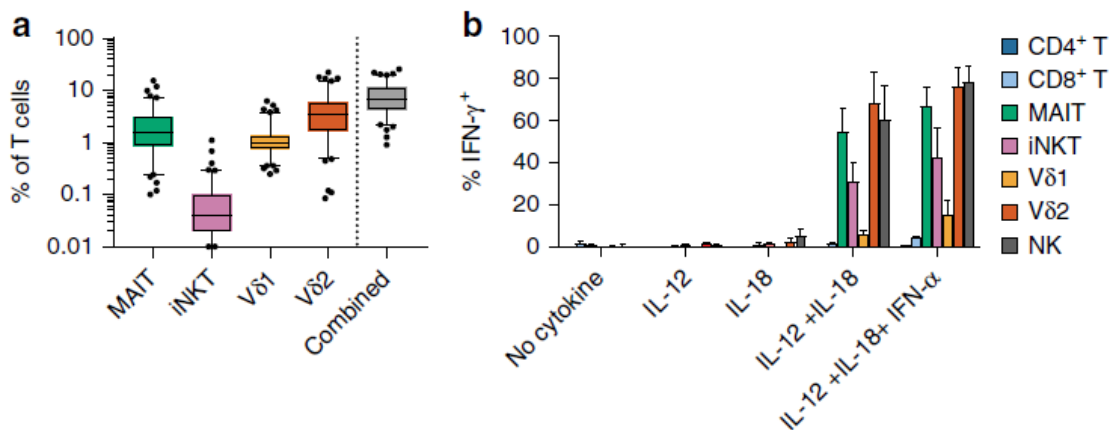


Figure 11 : Les LT innés chez l’Homme (Gutierrez-Arcelus M et al., 2019).

(a) Analyse en cytométrie en flux de leur fréquence au sein des LT totaux (n=101 donneurs sains) ; le groupe combiné inclut les iNKT, MAIT, et les LT Vδ1 et δ2. (b) Analyse en cytométrie en flux de leur capacité de production d’IFN-γ (marquage intra-cellulaire) en réponse à une stimulation de type innée (cytokines).

Les analyses en « *single cell RNAseq* » couplées à des expériences fonctionnelles montrent que le statut « *innate* » est caractérisé par : **i**) la présence d’ARNm (pour acide ribonucléique messager) préformés responsables des fonctions effectrices immédiates, **ii**) un potentiel prolifératif inférieur à celui des LT conventionnels. En effet, la transcription des ARNm liés aux fonctions effectrices (production de cytokines notamment d’IFN-γ, production de chimiokines, expression de l’arsenal cytotoxique et de molécules antioxydantes de la voie des pentoses phosphate) est priorisée par rapport à l’expression des gènes du complexe ribosomique (cf. **Figure 12**).

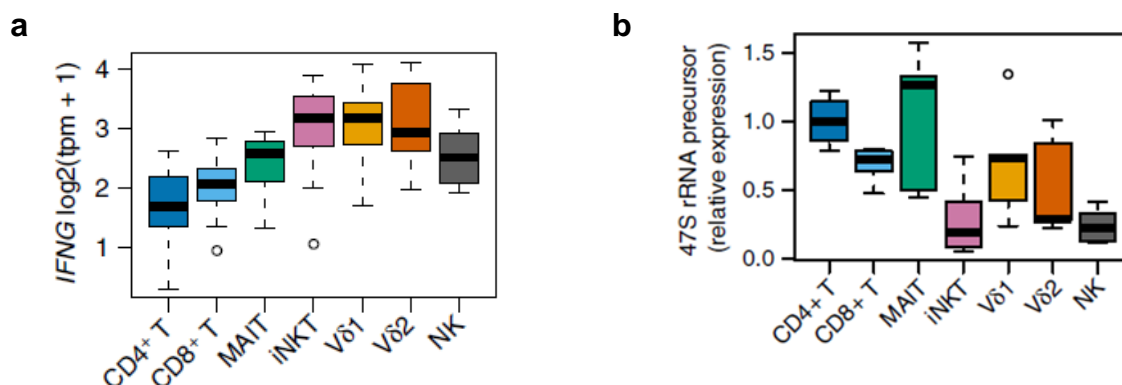


Figure 12 : Les LT innés ont un potentiel d’expression de l’IFN-γ accru et un potentiel de prolifération réduit (Gutierrez-Arcelus M et al., 2019).

Expression des ARNm de l’IFN-γ (a) et des ARNm ribosomiaux (qPCR du précurseur 47S RNA) (b), à l’état basal, par les LT conventionnels CD4/CD8, les MAIT, les iNKT, les LT Vγ1 et Vγ2 et, les cellules NK.

Le caractère « *adaptiveness* » a, quant à lui, pour signature transcriptomique une forte expression des acteurs de la machinerie transcriptionnelle conférant ainsi un haut potentiel de prolifération aux LT conventionnels CD4 et CD8. Les travaux de cette équipe révèlent enfin l'existence d'un gradient continu d'« *innateness* » au sein duquel se répartissent les différents contingents de LT innés entre les LT adaptatifs CD4/CD8 d'un côté et les cellules NK de l'autre : les MAIT, les iNKT, puis les LT- $\gamma\delta$.

Dans une première partie, nous décrivons les iNKT, les LT- $\gamma\delta$ et les MAIT et leur implication dans l'immunité antitumorale puis nous présenterons notre population d'intérêt, les LT CD8 « *innate memory* ».

III. Définition et activité antitumorale des différentes populations de LT innés

III.1. Les iNKT

III.1.1. Définition

Les NKT sont des LT non conventionnels restreints par la molécule du CMH de classe I non classique CD1d qui présente des antigènes non peptidiques : des glycolipides. Les NKT sont divisés en deux groupes :

- les NKT de type I ou iNKT possédant un TCR invariant : la chaîne α de leur TCR est issue du réarrangement $V\alpha 24-J\alpha 18$ chez l'Homme et $V\alpha 14-J\alpha 18$ chez la Souris (Berzins et al., 2011; Rossjohn J et al., 2012),
- les NKT de type II qui présentent une diversité de répertoire de la chaîne α de leur TCR.

Nous ne décrivons ici que les iNKT reconnus comme archétype des LT- $\alpha\beta$ innés. Ils constituent une population de LT innés très conservée chez l'Homme et la Souris. Les iNKT, comme leur nom l'indique, possèdent des marqueurs T comprenant le complexe CD3 et un TCR- $\alpha\beta$, et expriment des récepteurs de cellules NK (par exemple CD161, CD56, CD16, NKG2A et NKG2D chez l'Homme et NK1.1, CD122, NKG2A chez la Souris). Ils présentent un phénotype de cellule activée/mémoire ($CD45RO^+$, $CD62L^-$ chez l'Homme ; $CD44^+$ $CD62L^-$

chez la Souris) et expriment la molécule CD122 (chaîne β du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15). Chez l'Homme, les iNKT sont CD4⁺, CD8⁺ ou doubles négatifs (DN), tandis qu'ils sont CD4⁺ ou DN chez la souris (Berzins et al., 2011; Matsuda JI et al., 2008). Ils sont présents dans différents organes tels que la rate, la moelle osseuse, les poumons et les ganglions lymphatiques mais s'accumulent surtout dans le foie et l'omentum. Leur fréquence dans le sang humain est très faible et peut varier entre individus d'un facteur 1000, allant de 0,001% à 1% (Berzins et al., 2011).

III.1.2. Sélection et maturation

Leur différenciation thymique est régulée par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques. Ils sont sélectionnés positivement par des interactions avec des thymocytes doubles positifs (DP) qui expriment CD1d et un lipide endogène non identifié. La molécule CD1d joue ainsi un rôle dans leur activation mais également dans leur ontogénie. Leur sélection se distingue également de celle des LT conventionnels par la nécessité de mise en jeu de la voie SLAM-R/SAP/Fyn (récepteurs de la famille SLAM (pour *signaling lymphocyte activation molecule*) ; SAP (pour *SLAM associated protein*)) (Savage Ak et al., 2008; Verykokakis et al., 2010). Leur développement dépend des facteurs de transcription ERG2 (pour *early growth factor 2*) et PLZF (Shissler Sc and Tj, 2019) mais aussi de l'IL-15. Les souris déficientes en IL-15 ou en récepteur de l'IL-15 sont en effet dépourvues d'iNKT.

Chez la Souris, après sélection positive, les iNKT expriment CD69 (marqueur d'activation précoce) et passent par quatre stades de maturation au cours desquels ils acquièrent l'expression de CD44 et de NK1.1 tandis qu'ils perdent celle de CD24 (Godfrey Di and Sp, 2007).

Chez l'homme, à la sortie du thymus, ils sont CD4⁺ CD161⁻ et terminent leur maturation en périphérie devenant alors CD161⁺ (Berzins Sp et al., 2005).

III.1.3. Activation et fonctions

Leur mode d'activation est double, soit TCR-dépendant *via* la présentation de ligands naturels ou synthétiques de CD1d, soit TCR-indépendant (cytokine-dépendant) (cf. **Figure 13**).

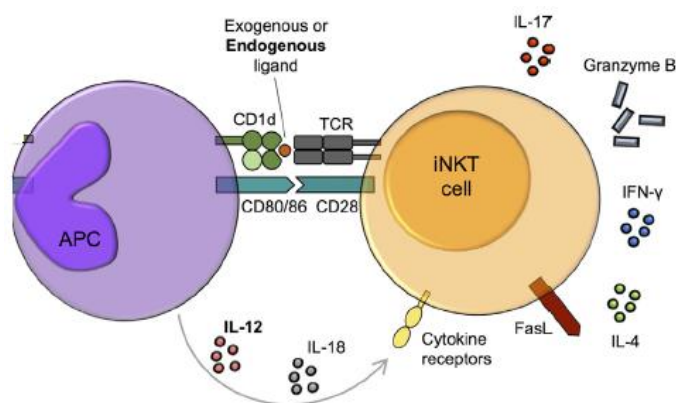


Figure 13 : Mécanisme d'activation des iNKT (Godfrey et al., 2018).

Les iNKT peuvent être activés *via* : **i**) la reconnaissance d'un ligand endogène ou exogène présenté par la molécule CD1d, **ii**) une combinaison de cytokines pro-inflammatoires (IL-12+IL-18) ou **iii**) les deux.

III.1.3.1. Activation des iNKT TCR-dépendante

Les iNKT reconnaissent des antigènes glycolipidiques présentés par CD1d grâce à ses deux poches hydrophobes. La molécule CD1d est une glycoprotéine transmembranaire apparentée aux molécules du CMH de classe I présente à la surface des DC, des monocytes, des macrophages et des LB et LT et capable de présenter aux iNKT des ligands endogènes ou exogènes (Ly and Moody, 2014).

L' α galactosylcéramide (α GC) est le ligand expérimental le plus couramment utilisé pour étudier les iNKT ; il s'agit d'un glycosphingolipide extrait des éponges marines (Kawano T et al., 1997). En 2000, l'équipe de Kronenberg a développé un tétramère constitué de quatre molécules CD1d chargées avec l' α GC permettant d'identifier en cytométrie en flux (CMF) les iNKT (Matsuda JI et al., 2000). Plusieurs analogues de l' α GC ont été synthétisés tels que l'OCH induisant préférentiellement une sécrétion d'IL-4 tandis que l' α -C-GalCer induit plutôt une sécrétion d'IFN- γ (Li et al., 2009).

En 2004, le groupe d'Albert Bendelac a découvert un ligand naturel endogène capable de stimuler les iNKT : l'iGb3 (isoglobotrihexosylceramide) (Zhou D et al., 2004). Une étude réalisée par Brennan *et al.* en 2011 présente le β -D-Glucopyranosylcéramide comme un candidat sérieux pour la sélection des cellules iNKT dans le thymus (Brennan Pj et al., 2011).

III.1.3.2. Activation des iNKT dépendante des cytokines

Une stimulation par l'IL-12 et l'IL-18 déclenche leur production d'IFN- γ (Leite-De-Moraes Mc et al., 1999; Matsuda JI et al., 2008). Ils peuvent également être activés par les interférons de type I (Wesley Jd et al., 2008), l'IL-33 (Bourgeois E et al., 2009), l'IL-1 β et l'IL-23 (Paget C et al., 2012).

L'activation des iNKT conduit à leur prolifération et à leur sécrétion rapide et massive d'un large spectre de cytokines (IL-4, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IFN- γ , TNF- α , TGF- β). Les iNKT possèdent également des fonctions cytotoxiques grâce à l'expression de la perforine, de granzyme, et de FAS-L (Takeda K et al., 2000).

On distingue plusieurs sous-populations en fonction de leur profil cytokinique et transcriptionnel (Kim et al., 2015; Lee et al., 2013b) :

- les iNKT1 qui ont un profil Th1 : production d'IFN- γ et expression de T-bet,
- les iNKT2 qui ont un profil Th2 : production d'IL-4 et forte expression de PLZF et GATA3 mais non expression de T-bet,
- les iNKT17 qui ont un profil Th17 : production d'IL-17 et expression de ROR γ t (pour *RAR-related orphan nuclear / ROR*) mais non expression de T-bet,
- les iNKT de type « *follicular helper T* » présentes dans les centres germinatifs : production d'IL-21 et expression de Bcl6 et CXCR5 (Chang Pp et al., 2011),
- les iNKT10 de type régulateur : production de TGF- β et d'IL-10 et caractérisés par la perte d'expression de PLZF (Lynch L et al., 2015).

Le spectre d'action attribué à ces cellules est ainsi particulièrement large. Ils ont un rôle régulateur, ils modulent les réponses immunitaires en produisant de grande quantité de cytokines en influençant à la fois leurs versants innés et adaptatifs. Ils sont impliqués dans

l'activation des cellules NK, des macrophages, des cellules B, des cellules T conventionnelles, dans la maturation des DC, et interagissent avec les LTreg (CD4⁺ CD25⁺) (Fujii et al., 2013; La Cava A et al., 2006). De ce fait, les iNKT jouent un rôle dans l'immunosurveillance antitumorale, l'immunité anti-infectieuse (anti-bactérienne et anti-virale) et la régulation de l'autoimmunité (Berzins et al., 2011). Comme évoqué ci-avant, ils participent également à l'homéostasie de certains tissus tels que le tissu adipeux et la peau. Les travaux de H. Tanno *et al.* ont récemment illustré *via* un modèle murin de souris déficientes en iNKT (souris J α 18KO (pour *knock-out*)) que ces derniers jouaient un rôle bénéfique dans le processus de cicatrisation cutanée en prévenant l'instauration d'une réponse inflammatoire chronique médiée par les PNN (Tanno H et al., 2017).

Récemment, une autre propriété fonctionnelle leur a été attribuée chez la Souris ; il s'agit de leur contribution à la génération des LT CD8 IM (pour *innate memory*) *via* leur sécrétion d'IL-4 (Weinreich et al., 2010a).

III.1.4. Rôle des iNKT dans l'immunosurveillance antitumorale

Dans de nombreux cancers chez l'Homme, une corrélation entre la survie globale et le statut fonctionnel des iNKT (sang périphérique et site tumoral) a été mise en évidence (Fujii Si and K, 2019). Le rôle des iNKT dans l'immunosurveillance antitumorale est démontré par les modèles murins déficients en iNKT (CD1d KO, J α 18KO). Chez la souris J α 18KO, on observe un développement accéléré des tumeurs induites par le MCA comparativement aux souris sauvages, et il a été mis en évidence une activité cytolytique directe des iNKT vis-à-vis des cellules cancéreuses (Smyth Mj et al., 2000). Wingender *et al.* ont également observé *in vivo* un potentiel de cytotoxicité des iNKT vis-à-vis de cellules tumorales cibles exprimant la molécule CD1d (Wingender G et al., 2010). Dans d'autres modèles murins, leur implication dans l'immunité antitumorale n'est pas liée à un effet cytolytique mais à leur capacité d'immunorégulation : inhibition des TAM (pour *tumor-associated macrophage*) (Song L et al.,

2009) ou potentialisation de l'activité antitumorale des cellules NK *via* leur grande production d'IFN- γ (Fujii S et al., 2002).

En thérapeutique, des stratégies basées sur l'administration de DC CD1d⁺ chargées d' α GC ont été testées dans plusieurs cancers (pulmonaire, tête et cou, myélome multiple, mélanome) (Fujii Si and K, 2019) avec une bonne tolérance et des réponses cliniques favorables dans certains cas. Deux études basées sur la technologie d'ingénierie des LT exprimant à leur surface un CAR (pour *chimeric antigen receptor*) dirigé contre un marqueur de surface exprimé par les cellules tumorales (*CAR T-cells*), évaluent l'effet d'un CAR-iNKT pour le traitement de neuroblastome (NCT03294954) et d'un CD19-CAR-aNKT allogénique pour traiter des lymphomes en rechute ou réfractaires (NCT03774654).

III.2. Les LT- $\gamma\delta$

III.2.1. Phénotype des LT- $\gamma\delta$

Les LT- $\gamma\delta$ possèdent un TCR composé des chaînes γ et δ dont la diversité de répertoire est moindre que celle des LT TCR- $\alpha\beta$. Chez l'Homme, les LT- $\gamma\delta$ exprimés présentent des réarrangements privilégiés comme V γ 9 avec V δ 2 (TV γ 9 δ 2) ou comme celui des chaînes V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8 avec la chaîne V δ 1. Leur TCR a une structure de type « *immunoglobulin-like* » (Allison Tj et al., 2001; Li H et al., 1998) suggérant un mode de reconnaissance de l'antigène différent des LT TCR- $\alpha\beta$. La majorité des LT- $\gamma\delta$ ne sont pas restreints par les molécules du CMH (Chien Yh et al., 2014; Vantourout P and Hayday A, 2013). Ils expriment rarement les corécepteurs CD4 et CD8. Ils représentent environ 0,5 à 10 % des lymphocytes circulants chez l'Homme et la Souris avec des sous populations aux caractéristiques distinctes chez l'Homme et la Souris. Chez l'adulte sain, les LT- $\gamma\delta$ V γ 9 δ 2 sont majoritairement présents dans la circulation sanguine, tandis que les TV δ 1 ont une fréquence accrue dans la peau et l'intestin.

Les LT- $\gamma\delta$ V γ 9 δ 2 sont activés par des métabolites dénommés « phosphoantigènes » dont la structure est liée à celle des précurseurs de la voie de synthèse des isoprénoïdes, tels que l'isopentenyl-pyrophosphate (IPP), le farnésyl-pyrophosphate ou des analogues synthétiques tels que le bromohydrine-pyrophosphate (BrHPP) (Boutin and Scotet, 2018). Les phosphoantigènes peuvent être exprimés par des cellules infectées ou tumorales ou, produits par des pathogènes intracellulaires tels que *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Listeria* sp., *Plasmodium* sp ainsi que d'autres bactéries telle que *Escherichia Coli*. Plusieurs travaux ont montré que l'activation des LT- $\gamma\delta$ V γ 9 δ 2 par les phosphoantigènes implique les butyrophilines, telle que la butyrophiline 3A1 (BTN3A1) (Boutin and Scotet, 2018; Rhodes et al., 2015; Sandstrom A et al., 2014; Vavassori S et al., 2013). Les butyrophilines appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et sont apparentées à la famille des molécules de co-stimulation CD80/86. A titre d'exemple, les phosphoantigènes présents au sein d'une cellule cancéreuse ou infectée activent un domaine intracellulaire de la BTN3A1 (B30.2) qu'elle soit localisée au niveau de la membrane cellulaire ou au niveau du réticulum endoplasmique, puis entraînent une modification de conformation de cette dernière et ainsi sa visibilité et sa reconnaissance à la surface cellulaire par le TCR des LT- $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2 (Boutin and Scotet, 2018). Notons que la reconnaissance des butyrophilines par le TCR des LT- $\gamma\delta$ ne se fait pas *via* les régions CDR3, mais met dans la plupart des cas en jeu une région située dans la troisième région charpente (FR (pour *framework*) 3) de V γ 4. Cette région dénommée HV4, également présente dans les domaines V β des chaînes β du TCR, est impliquée dans la reconnaissance des superantigènes viraux ou bactériens. En d'autres termes, la reconnaissance des butyrophilines par les LT- $\gamma\delta$ ressemble à celle d'un superantigène, indépendamment de la spécificité du TCR.

Les TV δ 1 humains reconnaissent d'autres ligands cellulaires tels que les protéines du CMH « class I-like » : EPCR (pour *endothelial protein C receptor*), CD1c, Cd1d, MICA et ULBP (pour *UL16-binding proteins*) (Godfrey et al., 2015).

III.2.2. Fonction des LT- $\gamma\delta$

Les TV γ 9 δ 2 reconnaissent des phosphoantigènes d'origine microbienne et jouent un rôle dans l'immunité anti-infectieuse bactérienne et parasitaire. Leur capacité effectrice résulte de l'intégration d'un ensemble de signaux : reconnaissance d'un phosphoantigène, et interaction de récepteurs *NK-like* activateurs ou inhibiteurs avec leurs ligands. Après stimulation antigénique, ils sécrètent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ et le TNF- α , surexpriment le récepteur de l'IL-2 et se différencient en cellules cytotoxiques (expression de la perforine et de granzymes A/B) (Godfrey et al., 2015).

La démonstration de leur implication dans l'immunosurveillance antitumorale provient de l'étude de souris déficientes en LT- $\gamma\delta$ qui présentent une incidence significativement augmentée de tumeurs chimioinduites comparativement aux souris sauvages (Gao Y et al., 2003; Girardi et al., 2001). Chez l'Homme, il a été montré *in vitro* que les TV γ 9 δ 2 et les TV δ 1 avaient la capacité de reconnaître et de lyser des cellules tumorales (Bouet-Toussaint F et al., 2008; Cordova A et al., 2012; Correia Dv et al., 2011; Corvaisier M et al., 2005).

Une association entre le statut des LT- $\gamma\delta$ et la survie globale des patients a été recherchée dans de nombreux cancers avec des résultats contradictoires. Dans le cadre de greffes de moelle allogénique de CSH pour leucémies aiguës myéloïdes ou lymphoblastiques, une association entre la survie globale et la survie sans progression a été mise en évidence (Godder Kt et al., 2007; Lamb Ls et al., 1996), tandis que chez des patients pris en charge pour des cancers de vessie, colo-rectaux et du sein, un effet négatif a été rapporté. Près d'une vingtaine d'essais cliniques ont étudié le potentiel anti-tumoral des TV γ 9 δ 2 dans différents cancers. L'effet thérapeutique attendu est basé sur une expansion des TV γ 9 δ 2 induite *in vitro* ou *ex vivo* par les

aminobiphosphonates, tel que le zoledronate, qui induisent une accumulation de métabolites de type IPP. Les auteurs de ces différents essais rapportent une bonne tolérance, néanmoins il n'y a pas eu de bénéfice clinique observé dans la majorité des cas (Godfrey et al., 2018). Plus récemment, Chauvin *et al.* ont rapporté une élimination spontanée par des TV γ 9V δ 2 allogéniques de cellules de glioblastomes mésenchymateux humains à la fois *in vitro* (cultures simpliquant un engagement du TCR indépendamment d'une spécificité de répertoire et dépendant de l'activation du récepteur activateur NKG2D (Chauvin C et al., 2019).

III.3. Les MAIT

Les MAIT ont été décrits de manière *princeps* en 2003 par une équipe française (Treiner E et al., 2003). Chez l'Homme, ils sont fortement représentés dans le sang (1 à 10% des LT), le foie (20% à 40%), le poumon et la lamina propria de l'intestin (Dusseaux M et al., 2011; Martin E et al., 2009). A l'instar des iNKT, les MAIT possèdent un TCR semi-invariant, précisément V α 7.2-J α 33/12/20 associés à V β 2 ou V β 13. Chez l'Homme, ils sont majoritairement CD8⁺ (70-90%), 10 à 20 % étant doubles négatifs et il existe une population minoritaire CD4⁺. Ils possèdent un phénotype mémoire effecteur (CD45RO⁺ CCR7⁻ CD62L^{lo}) et expriment CD161, CD26, CCR5, IL18R α , CCR6 ainsi que les facteurs de transcription PLZF, ROR γ T, et T-bet. Leur développement et leurs fonctions dépendent de la molécule non polymorphique du CMH de classe Ib dénommée MR1 (pour *major histocompatibility complex class I-related protein*). Leur TCR a la particularité de reconnaître des métabolites dérivés des précurseurs de la voie de biosynthèse de la vitamine B2 (riboflavine) présentés *via* la molécule MR1. La synthèse de ces métabolites est l'apanage des bactéries et des levures, conférant ainsi aux MAIT des fonctions anti-infectieuses. Deux dérivés du précurseur de la vitamine B2 dénommé 5-A-RU (pour *5-amino-ribityl uracil*) ont été identifiés comme puissants agonistes de MR1 : le 5-OE-RU et le 5-OP-RU. Ainsi, le TCR des MAIT reconnaît des complexes MR1:5-OP-RU *via* la région CDR3 de sa chaîne α (pour revue (Legoux F et al., 2020)). L'existence d'un lien étroit

entre la biologie des MAIT et le microbiote avait été évoqué en 2003 compte tenu de la mise en évidence de leur absence, dans le sang périphérique, chez les souris élevées en conditions stériles (Treiner et al 2003). Les mécanismes qui sous-tendent cette connexion se précisent au fil du temps, Legoux *et al.* ont montré en 2019 que les métabolites dérivés de la riboflavine produits par le microbiote intestinal contrôlaient, après circulation dans l'organisme, le développement intra-thymique des MAIT (Legoux F et al., 2019). Selon Legoux *et al.*, les signaux émanant du microbiote impactent leur développement thymique mais aussi leur expansion en périphérie et leurs fonctions au sein de certains organes (Legoux F et al., 2020).

Il existe deux modes d'activation des MAIT. L'un est dépendant de la reconnaissance par leur TCR de métabolites microbiens issus de la voie de synthèse de la vitamine B2. L'autre dépend d'une stimulation par des cytokines telles que l'IL-12, l'IL-18, l'IL-15 ou les interférons de type I, permettant ainsi une activation indépendante du TCR, en cas d'infection virale par exemple. Après activation, ils produisent des cytokines pro-inflammatoires de profil Th1/Th17 telles que l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-17 et l'IL-22, et sont capables d'exercer une activité cytolytique directe *via* leur expression de la perforine et de granzyme. Ils possèdent aussi des fonctions d'immunorégulation *via* leur interaction avec les DC, les LB, et les cellules NK. Il a été montré qu'ils jouent un rôle dans la cicatrisation cutanée. Une implication potentielle dans l'homéostasie des épithéliums en lien avec un dialogue avec le microbiote local a aussi été évoquée (Legoux F et al., 2020).

Etant donné leur abondance dans le foie, leur rôle dans les processus tumoraux impliquant le foie a été étudié. Une étude a rapporté une altération de la capacité de sécrétion de l'IFN- γ des MAIT isolés à partir de localisations métastatiques hépatiques (Shaler Cr et al., 2017). Une autre équipe a montré qu'une réduction de la fréquence des MAIT était corrélée à un pronostic sombre dans le contexte de carcinomes hépatocellulaires (Zheng et al., 2017).

III.4. Les LT CD8 mémoires non conventionnels

III.4.1. Différenciation des LT CD8 en cellules mémoires : les voies alternatives

Après une stimulation antigénique, les LT CD8 naïfs peuvent se différencier en LT CD8 effecteurs à courte durée de vie ou en cellules mémoires à longue durée de vie. Chez l'Homme et la Souris, de nombreux sous type ont été décrits (cf. **Figure 14**).

TABLE 1 | Memory CD8 T cell subsets.

Subset	Phenotype	Function	Location/Trafficking	Transcription factors	References
Tem	CCR7 ^{lo} /CD62L ^{lo} Cx3Cr1 ^{hi} /CD27 ^{lo} CD127 ^{hi} CD27 ⁻ /CD45RA ⁻ (humans)	++ Cytotoxicity + Proliferation	Circulation	Tbet ^{hi} Blimp1 ^{hi} /ID2 ^{hi} /STAT4 ^{hi}	(30, 37–44)
Tcm	CCR7 ^{hi} /CD62L ^{hi} Cx3Cr1 ^{lo} /CD27 ^{hi} CD127 ^{hi} CD27 ⁺ /CD45RA ⁻ (humans)	+– Cytotoxicity ++ Proliferation	Circulation Lymph nodes	Tbet ^{lo} Eomes ^{hi} /TCF1 ^{hi} /Bcl6 ^{hi} / STAT3 ^{hi} /ID3 ^{hi}	(30, 37–39, 42–49)
Temra (humans)	CCR7 ⁻ /CD27 ⁻ /CD45RA ⁺ CD127 ^{lo}	++ Cytotoxicity +– Proliferation	Circulation		(44)
Trm	CD69 ^{hi} /CD103 ^{hi} /CD49a ^{hi} (depending on tissue) CXCR3 ^{hi} /KLRG1 ^{lo} /CCR7 ^{lo} / CD62L ^{lo} , CD127 ^{hi} Cx3Cr1 ^{lo} /Int	Sensing and alarm + proliferation	Tissue resident	KLF2 ^{-/lo} /Eomes ^{-/lo} Tbet ^{lo} /TCF1 ^{lo} Hobit ^{hi} /Blimp1 ^{hi}	(33, 43, 50–60)
Tpm	CCR7 ^{+/-} /CD62L ^{+/-} /CD127 ^{hi} Cx3Cr1 ^{int} /CD27 ^{hi}	+ Cytotoxicity + Proliferation	Circulation Tissue trafficking Lymph nodes	Tbet ^{+/-}	(43, 61, 62)
Others	CD27 ^{lo} /CD43 ^{lo} KLRG1 ^{hi} , CD127 ^{lo}	++ Cytotoxicity +– Proliferation	Tissue trafficking	Tbet ^{hi} /Eomes ^{lo}	(32, 62)

Figure 14 : Les différentes populations de LT CD8 mémoires chez l'Homme et la Souris (Martin and Badovinac, 2018).

Tem : effector memory ; Tcm : central memory ; Temra : Tem with a terminally differentiated subset that expresses CD45RA ; Trm : tissue resident memory ; Tpm= Cx3Cr1 (fractalkine receptor) peripheral memory T cells.

Au début des années 2000, il a été montré chez la Souris que les LT CD8 naïfs peuvent également acquérir le phénotype et la fonction de cellules mémoires en l'absence de contact et de reconnaissance d'un antigène étranger ; on parle alors d'« *antigen-inexperienced memory phenotype T-cells* » (Jameson et al., 2015; Lee et al., 2011; White Jt et al., 2017). Le facteur de transcription Eomes de la famille T-box joue un rôle central dans l'acquisition du phénotype mémoire et dans les fonctions des « *antigen-inexperienced memory phenotype T-cells* » et leur permet de répondre efficacement à l'IL-15 qui joue un rôle crucial dans leur maintien de leurs fonctions.

Il a tout d'abord été observé chez la souris que des LT CD8 naïfs pouvaient acquérir dans le contexte d'une lymphopénie, un phénotype mémoire, indépendamment de la rencontre d'un antigène étranger. La génération de ce contingent dénommé « *lymphopenia-induced innate memory T-cell* » repose sur un mécanisme de prolifération homéostatique en réponse à des cytokines, notamment à l'IL-7 (transfert de LT CD8 naïfs dans des hôtes immunodéficients par modification génétique ou irradiation). Les « *lymphopenia-induced innate memory T-cells* » ont un phénotype : CD44^{hi} CD122^{hi} CD49d^{low} contrairement aux LT mémoires conventionnels qui expriment fortement CD49d (= intégrine α 4) (Goldrath Aw et al., 2000, 2004; Kieper and Jameson, 1999).

Par la suite, d'autres « *antigen-inexperienced memory phenotype T-cells* » ont, par la suite, été décrits en condition physiologique chez des hôtes immunocompétents (Martinet et al., 2015) :

- des LT- $\alpha\beta$ CD8SP (pour simple positif) naïfs ont la capacité d'acquérir un phénotype mémoire au cours de leur processus de différenciation thymique : les LT CD8 IM (pour *innate memory*)
- des LT- $\alpha\beta$ CD8SP naïfs ont la capacité d'acquérir un phénotype mémoire en périphérie en réponse à une stimulation cytokinique : les LT CD8 VM (pour *virtual memory*)

III.4.2. Mise en évidence chez la souris des LT CD8 IM

III.4.2.1. *Découverte des LT CD8 IM chez les souris déficientes en Itk ou Rlk*

Les LT CD8 IM ont été décrits de manière *princeps* au début des années 2000 chez des souris rendues génétiquement déficientes par recombinaison homologue (^{-/-}) en tyrosine kinase de la famille Tec (pour *tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma*) : Itk^{-/-} (pour *inductible T cell kinase*) et/ou Rlk^{-/-} (pour *resting lymphocyte kinase*) (Atherly Lo et al., 2006; Broussard C et al., 2006; Hu et al., 2007). Les tyrosines kinase Itk et Rlk interviennent dans la transduction du signal en aval du TCR (Andreotti et al., 2010; Prince Al et al., 2009). Les souris Itk^{-/-} et Rlk^{-/-} présentent des anomalies importantes comprenant un blocage de la différenciation

des LT CD4 et CD8 conventionnels au profit de l'émergence de LT CD8 caractérisés par l'expression d'un phénotype mémoire ($CD44^{hi}$ $CD122^{hi}$ $CD24^{lo}$ $CXCR3^{+}$) dès le stade thymique (donc indépendamment d'une stimulation antigénique exogène) et, des caractéristiques phénotypiques ($NK1.1^{+}$ et $CD69^{+}$) et fonctionnelles (capacité de production rapide d' $IFN-\gamma$ *ex vivo* en réponse à des *stimuli* innés) de cellules NK. Cette population qui a ainsi été dénommée LT CD8 IM (Atherly Lo et al., 2006; Broussard C et al., 2006; Liao and Littman, 1995; Schaeffer Em et al., 2000) (cf. **Figure 15**) exprime fortement le facteur Eomes qui fait figure de véritable signature fonctionnelle des LT IM chez la souris (Gordon et al., 2011). Les LT CD8 IM expriment également des marqueurs d'activation tels que CD25 (la chaîne α du récepteur de l'IL-2), et IL-4 R α (la chaîne α du récepteur de l'IL-4) (Weinreich et al., 2010a).

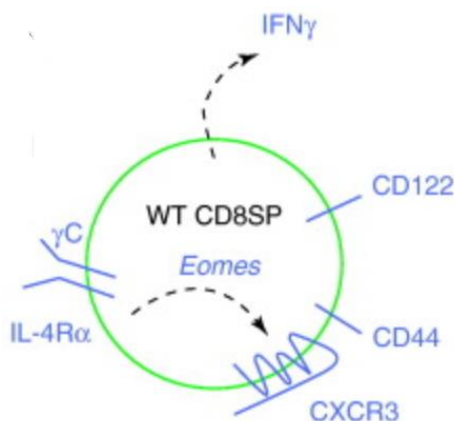


Figure 15 : Lymphocyte T CD8⁺ TCR- $\alpha\beta^{+}$ « innate memory » (Lee et al., 2011).

Ils expriment le facteur de transcription Eomes, des marqueurs mémoires (CD44, CD122, CXCR 3), des marqueurs de cellules NK comme NK1.1, et la chaîne α du récepteur de l'IL-4 et produisent l' $IFN-\gamma$ en réponse à une stimulation innée.

III.4.2.2. Ontogénie des LT CD8 IM

La différenciation des LT CD8 IM a lieu dans le thymus. A la différence des LT conventionnels CD4 et CD8 qui sont sélectionnés positivement par l'épithélium thymique, les LT CD8 IM, selon les travaux de Broussard *et al.*, seraient sélectionnés par des molécules du CMH de classe I (dont un tiers seraient non classiques) présentées par des cellules d'origine hématopoïétique.

L'expression d'Eomes est un évènement critique de la différenciation des LT CD8 IM. En effet, chez les souris *Itk*^{-/-}, les LT CD8 IM expriment tous et de manière homogène Eomes, tandis qu'en l'absence d'Eomes, ils ne sont pas décelables. Eomes contrôle l'expression du récepteur de l'IL-15 qui est un évènement critique pour leur différenciation, leur sortie du thymus et leur maintien en périphérie. En effet, les LT CD8 IM sont absents chez les souris *Itk*^{-/-} *IL-15*^{-/-} (Atherly Lo et al., 2006; Prince et al., 2014). Eomes cible également l'expression de *Bcl2* qui est un facteur critique pour la génération des LT CD8 mémoires à longue durée de vie par opposition aux cellules effectrices (Zhou et al., 2010). T-bet, un autre facteur de transcription de type T-box, partenaire habituel d'Eomes dans le compartiment mémoire, est très faiblement exprimé par les LT CD8 IM thymiques tandis que les cellules « *antigen-inexperienced memory phenotype T-cells* », lesquelles se différencient en périphérie, expriment à la fois Eomes et T-bet (Hu et al., 2007; Weinreich et al., 2010a).

Le développement des LT CD8 IM dépend de deux principales cytokines : l'IL-15, comme nous l'avons déjà évoqué et l'IL-4 produite par des *iNKT* PLZF⁺, des *NKT-γδ* PLZF⁺ ou des LT CD4 PLZF⁺ selon le contexte (Lee et al., 2011). Dans les modèles murins *Itk*^{-/-} ou *Rlk*^{-/-}, il a été montré que l'absence d'IL-4, de PLZF ou d'*iNKT* entraînait la disparition des LT CD8 IM (Verykokakis et al., 2010; Weinreich et al., 2010a). Il faut noter que la maturation des *iNKT* est perturbée chez les souris *Itk*^{-/-}, leur nombre étant diminué et seule une faible proportion d'entre eux présentant un phénotype mature (NK1.1^{hi}, CD122^{hi}). La maturation des *NKT-γδ*, une population particulière de LT identifiés chez la souris, ne semble pas en revanche nécessiter la mise en jeu des Tec kinases (pour revue (Andreotti et al., 2010). Les *NKT-γδ* partagent certaines propriétés avec les *iNKT* : leur localisation préférentielle splénique et hépatique, leur production d'IL-4 et d'IFN-γ, un phénotype activé et leur développement dépendant de PLZF et de SAP. Il a été montré dans le modèle murin *Itk*^{-/-} que l'expansion des

LT CD8 IM résulte de la régulation positive de la sécrétion d'IL-4 produite par les NKT- $\gamma\delta$ (Weinreich et al., 2010b).

III.4.2.3. Mise en évidence des LT CD8 IM dans d'autres souches murines

Par la suite, des LT CD8 IM ont été mises en évidence dans d'autres modèles transgéniques murins ; il s'agit de souris déficientes en : Klf2 (pour *kruppel-like factor*), molécule impliquée dans la régulation de la migration des LT, en Id3 (pour *inhibitor of DNA binding 3*), molécule impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire, ou en CBP (pour *C-AMP response element-binding protein*), une histone acétyl-transférase de nombreux facteurs transcriptionnels des LT (Verykokakis et al., 2010; Weinreich et al., 2010a). Comme nous l'avons déjà évoqué, la génération des LT CD8 IM dans ces modèles Klf2^{-/-}, Id3^{-/-}, CBP^{-/-} n'est pas due à l'absence d'expression de ces gènes mais à l'amplification de l'expression de l'IL-4 produite par des cellules exprimant PLZF : les iNKT et/ou les NKT- $\gamma\delta$ (Lee et al., 2011; Weinreich et al., 2010b). Dans ces modèles, le phénotype des LT CD8 IM est remarquablement identique : CD44⁺ CD122⁺ CXCR3⁺ IL-4R- α ⁺ et Eomes⁺.

Enfin, il faut noter que les LT CD8 IM ont aussi été décrits à l'état basal dans certaines souches de souris sauvages à des fréquences plus faibles que chez les souris transgéniques. Leur fréquence est plus élevée chez les souris BALB/c que chez les souris C57BL/6 car les NKT PLZF⁺ produisant de l'IL-4 sont physiologiquement abondants chez les souris BALB/c (Lee et al., 2013b).

Une équipe belge a récemment étudié chez la souris le rôle joué par Eomes sur le plan génétique au cours du processus de maturation des LT CD8 non conventionnels (Istaces et al., 2019). De manière intéressante, leurs résultats suggèrent qu'Eomes pilote la différenciation des LT CD8 IM sur la base d'un programme de modifications épigénétiques. Les LT CD8 IM et les LT CD8 mémoires conventionnels n'ont en commun qu'une partie de leur répertoire d'*enhancers* actifs. L'expression d'Eomes au sein des thymocytes CD8 SP entraîne une

reprogrammation qui dépend des *enhancers* liant le facteur de transcription RUNX3. Eomes est de plus associé à l'activateur de transcription BRG1 (pour *Brahma-related gene-1*) dans un complexe lié à la chromatine et contribue au recrutement de ce facteur de remodelage de la chromatine.

Miller *et al.* ont rapporté en mai 2020 leurs travaux testant si le mode de différenciation des « *antigen-inexperienced memory phenotype T-cells* » dépendait ou non de la signalisation *via* leur TCR (Miller et al., 2020). Les précédents travaux de Broussard *et al.*, et de Schaeffer *et al.*, suggéraient dans un modèle de souris transgénique TCR-anti-H-Y (anti-mâle) dans un fond *Itk*^{-/-} que le répertoire des LT CD8 IM n'avait pas de caractère autoréactif (Broussard C et al., 2006; Schaeffer Em et al., 2000), tandis qu'un modèle de souris transgénique TCR-anti-H-Y dans un fond sauvage n'excluait pas la possibilité que les LT CD8 IM aient un répertoire autoréactif (Dhanji et al., 2006). Le fait que la fréquence et le phénotype des « *antigen-inexperienced memory phenotype T-cells* » ne soient pas modifiés, ni chez les souris élevées en conditions stériles, ni chez les souris élevées en conditions stériles et nourries par un régime alimentaire de base, suggèrent que leur processus de différenciation est soit dépendant de la reconnaissance de ligands endogènes, soit indépendant d'une signalisation médiée par leur TCR (Jameson et al., 2015; White Jt et al., 2017). Leur étude de la diversité du répertoire TCR des « *antigen-inexperienced memory phenotype T-cells* », d'origine ganglionnaire et splénique, par séquençage à haut débit, chez des souris C57BL/6, montre : **i**) un répertoire très distinct des LT CD8 naïfs, **ii**) un répertoire hautement conservé d'une souris à l'autre ; ces données suggèrent un processus de différenciation impliquant le signal TCR. La réalisation d'expériences de co-cultures de clones d' « *antigen-inexperienced memory phenotype T-cells* » issus de souris TCR_g (souris exprimant un TCR monoclonal par transfection avec un vecteur rétroviral) avec des DC spléniques, en présence d'IL-2, puis avec ajout d'un AC bloquant les molécules du CMH de classe I, leur ont permis de montrer leur potentiel d'activation *via* la

présentation de ligands endogènes dans le contexte des molécules du CMH de classe I. Leur analyse des « *antigen-inexperienced memory phenotype T-cells* » au stade thymique (LT CD8 IM) montre que le signal TCR/ligand endogène est responsable d'une up-régulation d'Eomes au sein de niches thymiques « privilégiées », révélant ainsi une forte homologie avec la différenciation intra-thymique des LTreg FoxP3⁺.

III.4.2.4. Caractéristiques fonctionnelles des LT CD8 IM

Les LT CD8 IM sont capables de sécréter *in vitro* de l'IFN- γ en réponse à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (Jameson et al., 2015). Elles possèdent *in vivo/ex vivo* des ARNm pré-formés codant pour l'IFN- γ en l'absence de stimulation par le TCR, confirmant ainsi leur appartenance à la catégorie des LT innés (phénotype mémoire activé sans expérience antigénique). Elles pourraient ainsi contribuer à la première ligne de défense de l'organisme au même titre que les autres sous-populations LT innées. *In vivo*, dans un modèle de souris IFN- γ ^{-/-} très sensible à la bactérie *Listeria monocytogenes*, le transfert de LT CD8 IM issus de souris Itk^{-/-} IFN- γ ^{+/+} confère à l'hôte une protection vis-à-vis de la bactérie via leur production d'IFN- γ en réponse à une injection de lipopolysaccharide (Hu et al., 2007). Comparativement aux LT CD8 naïfs, les LT CD8 IM contrôlent plus rapidement une infection chronique par LCMV (pour *lymphocytic choriomeningitis virus*) via leur capacité de sécrétion rapide de cytokines (Lee et al., 2015). Leur signification physiologique n'est cependant pas encore totalement élucidée. Certains auteurs suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle important dans l'immunité innée anti-infectieuse en début et en fin de vie, deux périodes de susceptibilité accrue aux infections (Lambolez et al., 2007; Lee et al., 2009, 2010). Miller et al. ont récemment documenté de manière *princeps* chez la Souris une implication des LT CD8 IM dans l'immunité antitumorale. Dans un modèle d'adénocarcinome de prostate induit par un oncogène, ils ont mis en évidence une infiltration de la tumeur prostatique par les LT CD8 IM issus de souris donneuses consanguines, les LT CD8 IM représentant 2 à 17% des LT CD8

infiltrant la tumeur. De manière intéressante, ils ont observé que la majorité des LT CD8 IM transférés exprimaient fortement PD-1 (Miller et al., 2020).

III.4.3. Les LT CD8 « Virtual Memory » (VM)

Haluszczak *et al.* ont apporté la description *princeps* en 2009 chez la souris C57BL/6 non immunisée (ou « *antigen-inexperienced mice* ») de l'existence en périphérie de LT CD8 spécifiques d'antigènes exogènes, ayant un phénotype similaire à celui des LT CD8 IM (Eomes^{hi} CD44^{hi} CD122^{hi} CXCR3^{hi} CD62L^{hi}) mais sans expression de CD49d et produisant rapidement *in vitro* l'IFN- γ après une stimulation de type IL-12+IL-18 (Haluszczak et al., 2009). Elles peuvent ainsi être classées dans la catégorie des « *antigen inexperienced memory phenotype T-cells* ». Selon Haluszczak *et al.*, elles résultent d'une prolifération homéostatique médiée par des cytokines, ceci à l'image des LT CD8 générés dans un contexte de lymphopénie (Haluszczak et al., 2009). L'équipe de Jameson a confirmé ces résultats et a dénommé ces cellules semi-différenciées (CD44^{hi}CD49d^{lo}) LT CD8 « *Virtual memory* » (VM) (Akue Ad et al., 2012). A l'instar des LT CD8 IM, les LT CD8 VM sont absents chez les souris Eomes^{-/-}, ce qui fait d'Eomes une signature fonctionnelle majeure à la fois des cellules IM et VM. L'expression de CD122 à la surface des LT VM est pilotée par Eomes. Ils expriment également la sous-unité α du récepteur de l'IL-7 et de l'IL-4.

Les LT VM représentent 5 à 10% des LT CD8 sanguins et 10 à 20 % des LT CD8 spléniques. Ils sont générés en périphérie à partir de LT CD8 naïfs, l'IL-15 et la signalisation *via* le TCR jouant un rôle critique dans leur formation. Contrairement aux LT CD8 IM, les LT CD8 VM ne sont pas dépendants de la voie PLZF/IL-4/NKT. L'exposition à de faibles doses d'IL-15 permettrait leur survie en conditions basales *via* l'activation de STAT5 et de Bcl2 en aval, tandis que de fortes doses d'IL-15 activeraient leur prolifération *via* une activation de la voie MAP kinase/Akt (Hussain and Quinn, 2019). D'après le travail de Martinet *et al.*, les interférons de type I amplifient la génération des LT VM *via* deux mécanismes (Martinet et al.,

2015) : **i)** leur production en cas d'infection ou de stimulation inflammatoire augmente la sécrétion d'IL-15 par les CPA, **ii)** ils induisent une sensibilité accrue à l'IL-15 des LT CD8 VM *via* l'amplification de leur expression d'Eomes. Une fois généré, il a été montré que l'IL-4 amplifie le compartiment des LT CD8 VM et régule positivement la signalisation de l'IL-15. Cette dernière est transprésentée par le récepteur de la chaîne α de l'IL-15 (IL-15R α) à la surface des DC CD8 α^+ et le récepteur de la chaîne β de l'IL-15 (IL-15R β ou CD122) à la surface des LT CD8 VM.

Drobek *et al* (Drobek A et al., 2018) ont montré que la différenciation des LT CD8 VM se faisait préférentiellement, d'une part, à partir de cellules T naïves au sein desquelles la tyrosine kinase Lck (pour *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) est pré-couplée au corécepteur CD8, potentialisant ainsi la signalisation en aval du TCR, et d'autre part de cellules T naïves exprimant des marqueurs associés à une auto-réactivité du TCR tel que CD5 (Quinn et al., 2018; White et al., 2016). En dépit d'une expression potentielle d'un répertoire TCR auto-réactif, les LT CD8 VM ne favorisent pas l'émergence de pathologies auto-immunes selon les travaux de Drobek *et al.* (Drobek A et al., 2018).

Sur le plan fonctionnel, en termes de prolifération, de sécrétion de cytokines, et de cytotoxicité, les LT CD8 VM répondent plus rapidement à une stimulation TCR que les LT CD8 naïfs. La diversité des cytokines produites est en revanche moins diversifiée que celle des LT CD8 naïfs, avec une production majoritaire d'IFN- γ et de TNF- α (Quinn et al., 2018). Cette réactivité des LT CD8 VM, comparable à celle des LT CD8 mémoires conventionnels, s'explique par le fait que ce contingent est « pré-programmé » pour entrer en cycle (Lee et al., 2013a) et possède un profil épigénétique « paramétré » pour initier la transcription de gènes effecteurs cibles (Smith NI et al., 2018). Ces cellules ont également une capacité de réponse à des stimulations n'engageant pas leur TCR : prolifération *in vitro* en réponse à l'IL-15, production de cytokines et capacité de cytotoxicité « *by stander* » *via* l'expression d'IFN- γ , de

granzyme B et NKG2D en réponse à une stimulation de type IL-12+IL-18 (Akue Ad et al., 2012; Lee et al., 2013a; White et al., 2016). Quinn *et al.* ont récemment étudié leur profil d'expression de différents facteurs de transcription, ce dernier se distingue à la fois des LT naïfs et des LT mémoires conventionnels. Leur signature transcriptomique correspond à l'expression (Hussain and Quinn, 2019) :

- de facteurs de transcription associés aux cellules NK (par exemple *klra-i*, et *Sipr5*),
- de gènes impliqués dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires (par exemple *Ifng*, *Fasl*, *Tnf*)
- d'un arsenal cytotoxique (par exemple *Prfl*, *Gzma*)
- d'*Eomes* et de *Runx2* et de gènes reliés à la signalisation de l'IL-15 (par exemple *Il15ra* et *Bcl2*).

Sur le plan fonctionnel, elles confèreraient une protection de l'hôte au cours des stades précoces du développement de l'organisme en jouant un rôle d'effecteur à la frontière entre immunité innée et adaptative. Leur importance dans l'instauration rapide d'une immunité protectrice vis-à-vis de différents pathogènes viraux, bactériens ou parasitaires a été démontrée expérimentalement (Lanzer Kg et al., 2018; Lee et al., 2013a; Lin et al., 2019; Rolot et al., 2018). Les travaux de Smith *et al.* (Smith NI et al., 2018) suggèrent de plus que les LT migrants du thymus sont plus susceptibles de se différencier en LT CD8 VM aux stades précoces de la vie *versus* à l'âge adulte et que la rapidité de mise en jeu de leurs fonctions effectrices est supérieure en période néonatale *versus* à l'âge adulte.

III.4.4. Existence de LT CD8 innés chez l'Homme ?

En 2006, Warren *et al.* ont montré la présence dans le sang de cordon humain de LT CD8 possédant un phénotype mémoire de type EMRA (CD45RA⁺ CCCR7⁻ CD57⁺), exprimant les récepteurs de cellules NK de la famille KIR et capables de synthétiser rapidement l'IFN- γ . Leur mise en évidence dans le sang placentaire en dehors de tout contexte infectieux ou de pathologie placentaire, soit en l'absence d'une stimulation antigénique étrangère/exogène,

plaide en faveur d'une appartenance de ces LT CD8 KIR⁺ à la catégorie des LT innés (Warren Hs et al., 2006).

L'équipe allemande d'Arndt Borkhardt a posé directement la question chez l'Homme de l'existence d'équivalents des LT CD8 IM en l'absence d'Itk. Les auteurs ont décrit chez deux jeunes sœurs décédées d'un lymphome secondaire à une réponse cellulaire inadaptée à l'infection par le virus EBV, une mutation à l'état homozygote dans le domaine SH2 d'Itk conduisant à l'absence de la protéine. Le tableau clinique présenté par ces deux enfants issus d'une famille turque consanguine est proche de celui décrit chez des garçons porteurs de mutations des gènes SAP et XIAP (pour *X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*), à savoir une susceptibilité accrue à l'EBV pouvant entraîner une mononucléose infectieuse sévère, une lymphoprolifération ou un syndrome hémophagocytaire. Le point commun entre ces déficits immunitaires primitifs est l'absence virtuelle d'iNKT. De façon intéressante, les auteurs ont décrit, à l'instar des souris déficientes en Itk une surexpression d'Eomes au sein des LT CD8 : le taux d'ARNm d'Eomes étant multiplié d'un facteur de 1000 à 6000, comparativement aux parents hétérozygotes et à des sujets sains (Huck K et al., 2009).

Les travaux de l'équipe de Seong Hoe Park suggèrent l'existence de LT CD8 de type IM chez l'Homme au stade fœtal et durant les premiers mois de vie. Les auteurs ont mis en évidence des LT CD8 Eomes⁺ à des fréquences variables dans le thymus et la rate du fœtus, ainsi que dans le sang de cordon placentaire. Leur étude a montré que ces cellules possédaient un phénotype naïf (CD45RA^{hi}, CD45RO^{lo}), qu'un contingent significatif d'entre elles exprimait les molécules CD122 et CD161 (équivalent humain de NK1.1), que leur répertoire TCR était diversifié et qu'elles avaient la capacité de produire *ex vivo* immédiatement après stimulation l'IFN- γ (Min et al., 2011).

Bjorkstrom *et al.* ont caractérisé en 2012 le compartiment des LT CD8 KIR⁺ sanguins et montré qu'ils possédaient un phénotype mémoire de type EMRA, un répertoire biaisé utilisant

un nombre plus faible de V β différents comparativement aux LT CD8 totaux et aux LT CD8 EMRA conventionnels (Björkström Nk et al., 2012).

L'ensemble de ces données constitue des arguments indirects en faveur de l'existence de LT CD8 innés chez l'Homme. La question du rôle physiologique de ces cellules chez l'Homme reste cependant entière.

Mon laboratoire d'accueil s'est fixé pour objectif d'identifier chez l'Homme une population T CD8 ayant des caractéristiques communes avec les « *antigen inexperienced memory phenotype T-cells* » décrites chez la souris (LT IM et VM). Ainsi, nous avons mis en évidence, comme développé en introduction, chez l'Homme à l'âge adulte, dans le sang périphérique, une sous-population de LT CD8 mémoires exprimant fortement le facteur de transcription Eomes et possédant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de LT innés. Précisément, nous avons identifié un contingent de LT CD8 Eomes⁺ exprimant des récepteurs de cellules NK de type KIR/NKG2A, capables de produire rapidement l'IFN- γ en réponse à une stimulation n'engageant pas le TCR, telle que la combinaison de cytokines pro-inflammatoires IL-12+IL-18 et, exprimant le marqueur de dégranulation CD107a après une stimulation par un AC agoniste du CD16 (test de cytotoxicité redirigée de type ADCC) démontrant leur capacité de cytotoxicité naturelle. Nous avons aussi montré qu'elles possèdent un phénotype mémoire de type EMRA. Nous avons, de plus, révélé la présence de cette population dans le sang de cordon placentaire, renforçant ainsi notre hypothèse du caractère inné de ces cellules compte tenu de leur phénotype mémoire dans un environnement dépourvu de stimulation antigénique exogène (Jacomet et al., 2015). Notre travail a suscité un commentaire de Luc Van Kaer qui a précisé que nos données expérimentales étaient jusqu'alors les plus robustes pour soutenir l'existence de LT CD8 IM/VM chez l'Homme (Kaer, 2015).

En 2016, l'équipe de Jason T White a postulé que si le contingent T CD3⁺ CD8⁺ CD45RA⁺ KIR⁺ Eomes⁺ que nous avons identifié chez l'Homme, est bien un équivalent humain des LT

CD8 VM décrits chez la souris, ils présenteraient des propriétés de répartitions tissulaires et de fréquence selon l'âge comparables à celles observées chez la souris. A l'instar de ce qui a été décrit chez la souris, leurs résultats montrent que la fréquence de ce contingent est particulièrement élevée au niveau hépatique et corrélée à l'âge du sujet (augmentation avec le vieillissement) (White et al., 2016).

PARTIE III - LA LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE

I. Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne intégrée dans la famille des néoplasies myéloprolifératives comprenant également la thrombocytémie essentielle, la maladie de Vaquez et la myélofibrose primitive. La LMC-PC se traduit par une augmentation de la prolifération sans blocage de différenciation des progéniteurs myéloïdes au niveau de la moelle osseuse et, à l'hémogramme par une hyperleucocytose à PNN souvent associée à une basophilie et une éosinophilie, par une myélémie équilibrée et une thrombocytose modérée (pour revue (Sorel N et al., 2017)).

L'évolution naturelle de la maladie est caractérisée par trois phases successives :

- la PC sur plusieurs années (4-5 ans)
- la phase accélérée (PA) sur quelques mois (maximum 6-8 mois), inconstante
- la phase de transformation aigüe (ou phase blastique (PB)) caractérisée par la survenue d'une leucémie aigüe myéloblastique dans 2/3 des cas et lymphoblastique dans 1/3 des cas.

Dans la grande majorité des cas (95%), le diagnostic est réalisé en PC.

L'incidence est d'environ 800 nouveaux cas par an (0,6 à 1 cas pour 100 000 habitants). L'étiologie de la maladie est inconnue en dehors des rares cas secondaires à une exposition chronique au benzène ou aux radiations ionisantes (5% des cas). La maladie peut être découverte à tout âge et est plus fréquente chez l'adulte au-delà de 60 ans ; l'âge médian au diagnostic est de 57 ans. La maladie touche discrètement plus les hommes avec un sex ratio de 1,1 à 1,2. Dans la moitié des cas, le diagnostic est réalisé devant des anomalies de l'hémogramme découvertes de manière fortuite ; dans les autres cas, il s'agit d'un bilan de splénomégalie, d'asthénie ou plus rarement d'une complication thrombotique inaugurale.

II. Physiopathologie de la LMC

La LMC est caractérisée par la survenue au sein d'une CSH d'une anomalie cytogénétique acquise clonale, le chromosome Philadelphie (Ph), résultat d'une translocation réciproque et équilibrée $t(9;22) (q34;q11)$. Cette translocation conduit à une fusion entre les gènes *BCR* et *ABL1* (cf. **Figure 16**) (Sorel N et al., 2017).

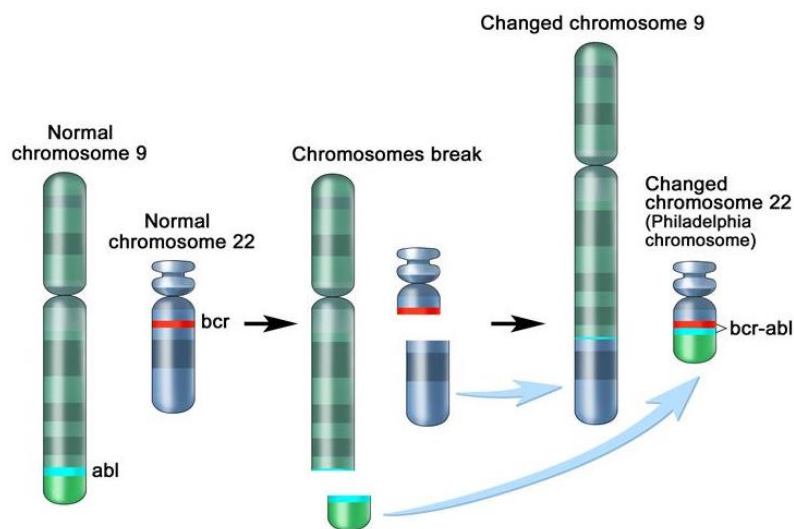


Figure 16 : Formation du chromosome Philadelphie par translocation réciproque et équilibrée $t(9 ;22)$ aboutissant sur le plan moléculaire à la formation de l'oncogène *BCR-ABL1*.

Le gène *ABL1* est un oncogène situé sur le bras long du chromosome 9. Il code pour une tyrosine kinase (TK) impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires : prolifération, différenciation et migration ; les protéines TK catalysent le transfert d'un phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) sur le résidu tyrosine d'une protéine. La protéine *ABL1* comprend dans sa partie N-terminale, les 2 lobes SH1 du domaine TK et les domaines régulateurs SH2, SH3. Le domaine SH1 comprend une suite d'hélice α et de feuillets β et est constitué de trois boucles : la boucle P qui se fixe au groupement phosphate de l'ATP, la boucle A qui permet l'activation de la protéine et la boucle C qui correspond au site catalytique assurant la phosphorylation des protéines substrats. La protéine *ABL1* est maintenue en conformation inactive par auto-inhibition, cette auto-inhibition résultant d'interactions fortes

entre les domaines SH2 et SH3 et le domaine catalytique, ainsi que de l'action du groupement myristate N-terminal. L'activation de la protéine découle d'un déverrouillage par le groupe myristoyl, d'un déclampage des domaines SH2 et SH3, suivi d'un changement de conformation de la boucle A d'activation. Ce dernier entraîne l'autophosphorylation de la tyrosine en position 393 et stabilise la protéine sous forme active.

Le gène *BCR* est situé sur le bras long du chromosome 22. Il code pour une protéine exprimée de façon ubiquitaire dans le cytoplasme des cellules et qui possède une activité sérine/thréonine kinase et une activité GTPase.

Concernant la formation de l'oncogène de fusion *BCR-ABL1*, les points de cassure au niveau du gène *ABL1* se situent entre les exons 1a et 1b. Il existe différents points de cassure sur le gène *BCR* à l'origine de la synthèse de transcrits de tailles différentes. Dans 95% des cas, le point de cassure se situe dans la région M-BCR et on observe 2 types d'ARNm *BCR-ABL1* : e13a2 (ou b2a2) ou e14a2 (ou b3a2) selon si le point de cassure se situe dans l'intron 13 ou 14 de *BCR*. Les deux ARNm codent la même protéine de fusion de 210 KDa dénommée p210 BCR-ABL1.

Le produit du gène de fusion *BCR-ABL1* est une protéine dont l'activité TK dérégulée est nécessaire et suffisante à la leucémogénèse. La protéine TK BCR-ABL1 est localisée dans le cytoplasme ; elle est caractérisée par la perte de la région N-terminale d'ABL1 et donc de sa partie inhibitrice, entraînant ainsi l'activation constitutive de la TK d'ABL1. Cette dernière est responsable de l'activation de nombreuses voies de signalisation avec pour conséquence : une prolifération excessive des cellules de la lignée granuleuse (voies RAS, MAP kinases, JAK/STAT, MYC), une diminution de l'apoptose (voie PI3kinase/AKT) et une perte de l'adhérence cellulaire au stroma médullaire expliquant la myélémie (phosphorylation constitutive de la protéine CRKL (pour *chicken tumor virus 10 regulator of kinase-like*)), et

enfin une instabilité génétique (dérégulation des protéines participant à la réparation de l'ADN (pour acide désoxyribonucléique) (Sorel N et al., 2017).

III. Diagnostic biologique

III.1. Hémogramme

L'hémogramme montre classiquement une hyperleucocytose (souvent > 50 giga/L, parfois beaucoup plus importante) constituée de PNN, de basophiles et d'éosinophiles, accompagnée d'une myélémie abondante et équilibrée, c'est-à-dire constituée essentiellement de cellules matures (métamyélocytes, myélocytes). Un faible pourcentage de blastes circulants est possible mais il n'y a pas de hiatus leucémique. Le pourcentage de blastes circulants est l'un des paramètres entrant dans le calcul des scores pronostiques (Sokal et ELTS (pour *eutos long term survival*) (Pfirrmann et al., 2020; Sokal et al., 1984). Une anémie normochrome normocytaire est possible mais inconstante. Une thrombocytose, en général modérée, est fréquente, parfois même isolée.

III.2. Myélogramme et analyse cytogénétique

Le prélèvement médullaire permet de préciser la phase de la maladie (chronique, accélérée ou blastique) et de réaliser le caryotype initial. Ce dernier met en évidence le chromosome Ph dans 95% des cas et permet la recherche d'anomalies cytogénétiques additionnelles.

III.3. Biologie moléculaire

Toute suspicion de LMC implique de rechercher un transcrite de fusion *BCR-ABL1* dans le sang par des techniques de biologie moléculaire (*polymerase chain reaction* ou PCR). L'identification du type de transcrite permettra le suivi ultérieur de la réponse au traitement. La maladie résiduelle est exprimée sous forme de ratio (%) : nombre total de copies *BCR-ABL1* sur le nombre total de copies du gène de contrôle (en France on utilise le gène *ABL1*) contenu dans le même volume échantillon (% *BCR-ABL1/ABL1*) (Sorel N et al., 2017).

IV. Scores pronostiques

Le score de Sokal évaluant la probabilité de survie des patients a été établi à l'ère de l'HYDREA (Sokal et al., 1984) et est resté valide à l'ère de l'imatinib ; il est couramment utilisé. Il prend en compte au diagnostic quatre facteurs pronostiques indépendants : âge, taille de la rate, le pourcentage de blastes sanguins et enfin, la numération plaquettaire. Il définit trois catégories de risque : risque faible (score inférieur à 0,8), risque intermédiaire (score compris entre 0,8 et 1,2) et risque élevé (score supérieur à 1,2). En 2016, un score évaluant la probabilité de décès en lien avec la progression de la LMC a été établi à partir d'une vaste cohorte de patients européens (registre EUTOS (pour *European treatment and outcome study*), n= 2205 patients) ; il s'agit du score ELTS (pour *EUTOS long term survival*) (Pfirrmann M et al., 2016). Les recommandations de l'ELN (pour *European leukemia net*) publiées en 2020 préconisent l'utilisation du score ELTS pour évaluer le pronostic au diagnostic de la maladie (Hochhaus et al., 2020).

V. Traitement de la LMC

V.1. Historique

A partir de 1950, l'administration de traitements cytoréducteurs, busulfan puis hydroxyurée, a permis de normaliser l'hémogramme mais pas de freiner l'évolution de la maladie en leucémie aigüe. A partir des années 1980, l'allogreffe de CSH est proposée chez les patients éligibles ayant un donneur ; c'est le seul traitement curatif de la LMC.

Chez les patients LMC-PC, le premier traitement ayant démontré une réelle efficacité lorsqu'une allogreffe de CSH n'était pas envisageable, est l'IFN- α (pour interféron α). Ce dernier permettait d'obtenir chez environ 20% des patients des réponses cytogénétiques complètes ou RCyC (correspondant à l'absence de détection du chromosome Ph lors de l'examen médullaire) de longue durée, qui se maintenaient pour certaines, après l'arrêt du

traitement (Mahon et al., 2002). L'association d'un analogue nucléosidique de la pyrimidine, la cytarabine à l'IFN- α a montré par rapport à un traitement par IFN- α seul une amélioration significative du taux de réponses cytogénétiques majeures (RCyM ; correspondant à 0 à 35% de cellules Ph⁺ en métaphase) 12 mois post randomisation (41% *versus* 24%) et de la survie à 3 ans (86% *versus* 75%) (Guilhot et al., 1997) (cf. **Figure 17**).

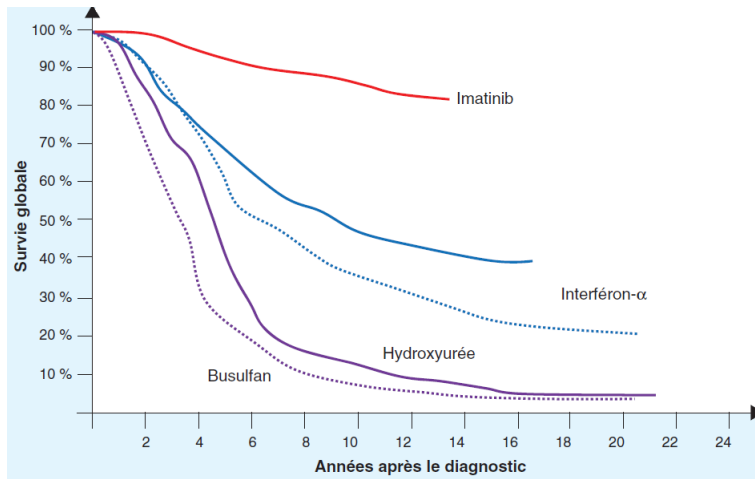


Figure 17 : Historique des traitements de la LMC (Busulfan, Hydroxyurée, les différents essais de l'interféron- α , et de l'imatinib) et survie globale des patients (Sorel N et al., 2017).

V.2. Les ITK

En 1998, a été testé un premier ITK, le STI 571 (pour *signal transduction inhibitor 571*) ou imatinib mésylate, lequel a montré des résultats spectaculaires dans l'étude de phase I de Druker BJ *et al.* (Druker et al., 2001). L'imatinib cible spécifiquement l'activité TK de l'oncoprotéine ABL1, du récepteur c-KIT (récepteur de SCF pour *stem cell factor*) et du récepteur du PDGF (pour *platelet-derived growth factor*). Ce médicament administré par voie orale agit comme un inhibiteur compétitif de l'ATP en l'empêchant de se fixer au domaine TK de BCR-ABL1. Dans cette première étude de phase I menée chez des patients LMC-PC résistants ou intolérants à l'IFN- α , les auteurs ont rapporté une bonne tolérance et l'obtention de 31% de RCyM et de 13% de RCyC chez les patients recevant une dose ≥ 300 mg par jour d'imatinib (Druker et al., 2001). En 2003, l'imatinib est testé en première ligne comparativement à l'association IFN- α et cytarabine ; avec un suivi médian de 19 mois, le taux

de RCyC à 18 mois de l'initiation du traitement est très supérieur dans le bras imatinib *versus* le bras de l'association IFN- α et cytarabine (76,2% *versus* 14,5%) (O'Brien et al., 2003).

Les ITK de deuxième génération (dasatinib, nilotinib, bosutinib) (ITK-2G) ont été développés pour les situations d'échec ou d'intolérance à l'imatinib (environ 45% des cas). Les mutations du domaine TK de BCR-ABL sont l'une des causes de résistance à l'imatinib et représentent environ 25% des cas. Les ITK-2G ont ensuite été testés en première ligne comparativement à l'imatinib, et ont montré des réponses moléculaires plus précoces et plus profondes. Actuellement, en France sont remboursés en première intention l'imatinib, le nilotinib et le bosutinib (Hochhaus et al., 2020).

La survenue d'une mutation de type T315I confère une résistance à tous les ITK sauf au ponatinib ; cet inhibiteur de troisième génération est seul à être efficace car il ne contracte pas de liaison avec la thréonine en position 315 (O'Hare T et al., 2009).

Grâce aux ITK, l'espérance de vie des patients LMC-PC est devenue quasi identique à celle de la population générale (Hochhaus et al, 2020). Les inhibiteurs de deuxième et troisième générations doivent être manipulés avec précaution car ils peuvent entraîner des effets secondaires graves (complications thrombotiques, hypertension artérielle pulmonaire entre autres).

Les ITK n'ont pas la capacité d'éradiquer la totalité des cellules leucémiques BCR-ABL⁺. Ils sont donc en théorie administrés « à vie » avec nécessité d'une bonne observance. Pour les spécialistes, la prise en charge consiste à optimiser la qualité de vie en adéquation avec l'efficacité du traitement, à prévenir la survenue de complications, et enfin à accompagner le patient dans ses projets professionnels (gestion du temps de travail) et personnels (conception, grossesse). Pour la société, s'ajoute la problématique du coût du traitement par ITK et de la prise en charge des effets indésirables. Un arrêt du traitement par ITK est parfois possible chez des patients sélectionnés. Ce point sera développé dans le chapitre VIII.5.

V.3. Les inhibiteurs allostériques

Les inhibiteurs allostériques comme GNF2 et ABL001 peuvent se fixer sur le site de myristoylation et mimer l'autoinhibition existante dans la protéine ABL non réarrangée. L'ABL001 ou asciminib a été testé en phase I (NCT02081378) chez les patients atteints de LMC et de leucémie aigüe lymphoblastique à chromosome Ph résistants ou intolérants aux ITK (Hughes Tp et al., 2019). L'étude clinique comprenait plusieurs groupes de traitement dans lesquels l'asciminib était testé seul ou en association avec imatinib, nilotinib, ou dasatinib. L'asciminib a également été testé dans une phase III *versus* bosutinib chez des patients LMC-PC résistants ou intolérants à au moins deux ITK (NCT03106779). Une étude de phase II randomisée évalue actuellement l'efficacité et la tolérance la combinaison asciminib et imatinib, *versus* imatinib seul, *versus* switch pour nilotinib chez des patients LMC-PC traités par imatinib et n'ayant pas obtenu de réponse moléculaire profonde (NCT03578367).

L'arsenal thérapeutique actuel comporte donc en France cinq ITK, et un inhibiteur allostérique (disponible seulement en ATU nominative actuellement). Des essais cliniques testant de nouveaux ITK sont en cours à travers le monde. L'allogreffe de CSH n'est utilisée concernant la LMC-PC qu'en cas d'échec aux traitements oraux disponibles.

VI. Surveillance et suivi de la maladie

La LMC est un modèle de suivi hématologique. La surveillance des patients associe : un examen clinique avec palpable de la rate, une surveillance de l'hémogramme, une surveillance cytogénétique sur moelle tous les 6 mois jusqu'à l'obtention d'une RCyC et une surveillance moléculaire de la décroissance du taux de transcrite *BCR-ABL1* (PCR quantitative des ARNm *BCR-ABL1*), réalisée sur un prélèvement sanguin trimestriel puis semestriel. La rémission hématologique est le premier critère de réponse au traitement, laquelle est caractérisée par une normalisation de l'hémogramme et la disparition des symptômes de la maladie. L'obtention d'une RCyC est corrélée à la survie globale. L'obtention d'une réponse moléculaire majeure

(MMR qui correspond à un ratio $BCR-ABL1/ABL1 \leq 0,1\%$) est l'objectif principal du traitement afin de garantir au patient la meilleure survie sans événement. Cependant, au cours des dernières années, le maintien des patients en rémission (maintien de leur MMR) après arrêt de leur ITK est devenu un nouvel enjeu dans la prise en charge des patients. On parle alors de TFR (pour *treatment free remission*). La TFR permet prévenir la survenue d'effets indésirables, d'améliorer la qualité de vie et de limiter le coût de la prise en charge pour la collectivité. L'obtention d'une réponse moléculaire profonde MR4 (pour *molecular response* de type 4) qui correspond à une réduction de 4 log de la maladie par rapport au diagnostic (ratio $BCR-ABL1/ABL1 \leq 0,01\%$) ou MR4.5 qui correspond à une réduction de 4.5 log (ratio $BCR-ABL1/ABL1 \leq 0,0032\%$) est un prérequis nécessaire à une tentative d'arrêt du traitement par ITK. On parle alors de DMR (pour *deep molecular response*).

VII. Stratégies d'arrêt de traitement par ITK

L'essai clinique français STIM (Stop Imatinib) réalisé chez des patients en DMR prolongée ($MR4.5 \geq 2$ ans), a apporté la démonstration *princeps* d'arrêts de traitement par ITK sans rechute moléculaire en dépit de la persistance d'une maladie résiduelle. Cinq ans après l'arrêt du traitement, 40% des patients sont en situation de survie sans récurrence moléculaire ou RFS (pour *relapse free survival*) (Mahon et al., 2010). Les résultats ont montré que la majorité des rechutes (80%) ont lieu au cours des 6-8 premiers mois, soulignant la nécessité d'une surveillance moléculaire mensuelle durant cette période. Depuis l'essai clinique STIM, de nombreux essais ont été conduits à travers le monde et ont montré en dépit d'une variabilité dans les critères d'éligibilité (durée de traitement par ITK, durée de DMR, type de DMR) et de reprise du traitement (positivité de la PCR ou perte de la MMR sur une ou deux analyses) des résultats reproductibles avec environ 50% des patients qui obtiennent une TFR se maintenant 12 mois après l'arrêt du traitement. Le plus vaste essai clinique d'arrêt EURO-SKI a inclus 755 patients avec un taux de TFR similaire (Saussele et al., 2018). Le critère de reprise du traitement

qui s'est imposé correspond à la perte de la MMR (Rousselot et al., 2014). Après reprise du traitement par ITK, la majorité des patients (90 à 95%) retrouvent leur réponse moléculaire antérieure. Bien qu'au-delà de 12 mois, le risque de récurrence moléculaire devienne faible, il est nécessaire de poursuivre la surveillance moléculaire. Les mécanismes qui sous-tendent l'absence de récurrence moléculaire ne sont pas à l'heure actuelle élucidés, l'hypothèse d'un contrôle du clone leucémique résiduel par le SI est étudiée. Ce point sera traité dans le chapitre VIII.5 et fait l'objet de la thématique de recherche de ce travail de thèse.

Différents facteurs pronostiques d'un succès d'arrêt ont été rapportés : la durée de traitement par ITK, la durée de DMR et l'exposition antérieure à l'IFN- α ont été identifiés comme des facteurs impactant significativement l'absence de récurrence moléculaire au cours des 6 premiers mois dans l'essai EURO-SKI (Saussele et al., 2018).

Les critères d'éligibilité à l'arrêt du traitement proposé par le groupe d'experts français Fi-LMC sont présentés **Figure 18**.

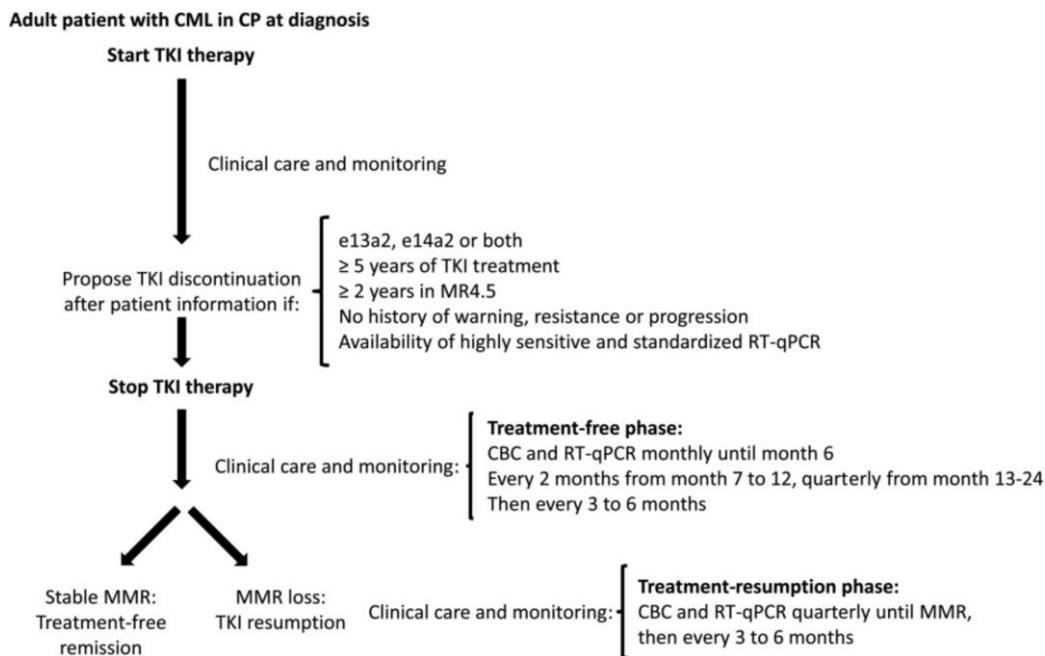


Figure 18 : Recommandations du groupe français Fi-LMC concernant l'arrêt de traitement par ITK dans la LMC.

CBC : complete blood count ; CML : chronic myeloid leukemia ; CP : chronic phase ; MMR : major molecular response ; MR4.5 : molecular response 4.5 ; RT-qPCR : real-time quantitative polymerase chain reaction ; TKI : tyrosine kinase inhibitor

VIII. Le SI et la LMC

VIII.1. Introduction

Le SI peut jouer un rôle critique dans le contrôle de la LMC. L'effet GVL associé à l'allogreffe de CSH est à l'heure actuelle la seule option curative de la LMC. Des antigènes présentés par les molécules du CMH de classe I tels que le peptide antigénique PR1 dérivé de PR3 (pour protéinase 3), la protéine WT-1 (pour *wilms tumour 1*) et la télomérase peuvent être reconnus par le SI comme des antigènes tumoraux au cours de la LMC (Gannagé et al., 2005; Gao et al., 2000; Molldrem et al., 2000). Chez les patients en RCyC ou MMR qui ont été traités par IFN- α , par imatinib ou par allogreffe de CSH, une augmentation significative de la fréquence des LT CD8 spécifiques de ces antigènes a été rapportée (Gannagé et al., 2005; Gao et al., 2000; Molldrem et al., 2000). Ces données ont conduit à la réalisation d'essais cliniques de vaccinations ; une faible toxicité et des réponses à la fois immunologiques et cliniques (amélioration de la réponse cytogénétique) ont été rapportées (Bocchia et al., 2005, 2010). Ces résultats démontrent le rôle de l'immunité adaptative dans le contrôle de la LMC et font de cette dernière une maladie candidate à un ciblage du SI. Notons que l'épitope de fusion b3a2 peut être à l'origine d'une réponse T CD8 spécifique dans un contexte de restriction HLA-A3 (Berke Z et al., 2000; Bocchia et al., 1996). En revanche, il n'existe pas de réponse T CD8 spécifique du peptide de fusion restreinte par HLA-A2 du fait d'une trop faible affinité pour HLA-A2 (Gannagé et al., 2005).

VIII.2. Anomalies du SI au diagnostic de la LMC

VIII.2.1. Anomalies des effecteurs

Des anomalies numériques et fonctionnelles des cellules NK ont été décrites au diagnostic de la LMC en PC, PA et PB (Chen et al., 2012; Mellqvist et al., 2000; Pierson and Miller, 1996). Au cours des phases avancées de la LMC, Nakajima *et al* (2002) ont rapporté que, contrairement à la PC, les cellules NK pouvaient exprimer la protéine BCR-ABL et qu'elles

présentaient une altération de leur différenciation (Nakajima H et al., 2002). En 1990, Verfaillie *et al.*, ont montré une diminution de la cytotoxicité des NK (prélèvement de cellules mononucléées périphériques (CMN) de 15 patients LMC-PC et de 10 patients en phases avancées) vis-à-vis de la lignée K562 (lignée cellulaire représentant la LMC en phase blastique, dépourvue d'expression des molécules du CMH de classe I) ainsi qu'une diminution de la prolifération en réponse à une stimulation par l'IL-2 (Verfaillie et al., 1989). Boissel *et al.* (2006) ont montré une expression augmentée de MICA à la surface des cellules CD34⁺ de patients LMC-PC pouvant faciliter la lyse par les cellules NK exprimant NKG2D. Cependant, ils ont également observé chez ces patients des niveaux élevés de MICA solubles facilitant ainsi l'échappement des cellules leucémiques à la lyse par les cellules NK en bloquant la signalisation mise en jeu par NKG2D (Boissel N et al., 2006).

A l'instar des cellules NK, un déficit numérique et fonctionnel des DC notamment dans la présentation antigénique aux LT a été rapporté au diagnostic chez les patients LMC-PC (Boissel N et al., 2004; Dong et al., 2003; Mohty et al., 2001, 2002). Brown *et al.* ont montré, à partir de cultures de CMN de patients, qu'au sein des DC, l'activité TK dérégulée de la protéine BCR-ABL entraînaient des anomalies de maturation et de l'organisation du cytosquelette d'actine, lesquelles étant responsable d'une diminution des capacités de migration et d'apprêtement de l'antigène par les DC (Brown et al., 2014). Dans un modèle murin de LMC, les DC BCR-ABL⁺ sont immatures et n'induisent que de faibles réponses T CD8 cytotoxiques dans les organes lymphoïdes secondaires (Mumprecht et al., 2009).

Des LT CD8 anti-LMC (dirigés contre la région de jonction BCR-ABL et des antigènes de cellules « normales » qui sont surexprimés tels que PR1, WT1 et la télomérase) ont été mis en évidence dans le sang périphérique au diagnostic de la LMC. Cependant leurs capacités fonctionnelles sont altérées, à savoir la signalisation en aval du TCR, le potentiel de

cytotoxicité, et de sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ ou le TNF- α (Baniyash M, 2004; Li et al., 2012; Zha et al., 2012).

L'expression de CD62L par les CTL est critique pour leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires et leur priming par les CPA. Sopper *et al.* ont rapporté une diminution de l'expression de surface de CD62L par les LT CD8 des patients LMC au diagnostic (Sopper et al., 2016).

Comme évoqué dans notre Introduction Générale Partie I, les interactions de type PD-1/PD-L1 peuvent contribuer à la répression d'une réponse T effectrice efficace. Mumprecht *et al.* ont analysé dans un modèle murin de LMC (utilisation d'un vecteur rétroviral) la réponse T CD8 anti-LMC en PC et en PB (Mumprecht et al., 2009). Leurs résultats montrent un état d'épuisement des LT CD8 anti-LMC qui sont caractérisés par une forte expression de PD-1, une activité cytolytique limitée, et une absence de production d'IFN- γ /TNF- α et de prolifération après stimulation. Ils ont observé une expression de PD-L1 à la surface des cellules du clone leucémique. Le blocage de la voie PD-1/PD-L1 par génération de souris PD-1 déficientes ou l'administration d'AC anti-PD-L1 prolonge dans leur modèle la survie des souris LMC-PB. Ils ont également mis en évidence une surexpression de PD-1 à la surface des LT CD8 des patients LMC-PC comparativement à des donneurs sains. Hughes *et al.* ont à partir de prélèvements de patients LMC-PC au diagnostic confirmé une augmentation de l'expression de PD-1 par les LT CD8 et CD4 des patients comparativement à des donneurs sains (Hughes A et al., 2017).

Mon équipe de recherche a, quant à elle, décrit en 2012, chez les patients LMC-PC, une altération de la capacité de prolifération des iNKT en réponse à une stimulation de leur TCR par l' α -GC, un défaut de leur expression de perforine et de Fas-L ainsi que du facteur de transcription PLZF. A l'instar de ce qui a été rapporté chez la souris, le défaut d'expression de PLZF par les iNKT des patients LMC-PC s'accompagne d'une altération de leur capacité de

sécrétion d'IL-4 en réponse à une stimulation de type PMA-ionomycin tandis que leur capacité d'IFN- γ est similaire à celle des sujets sains. De manière intéressante, ces anomalies fonctionnelles sont restaurées chez les patients en rémission après traitement par imatinib ou IFN- α (RCyC, MMR ou DMR) (Rossignol et al., 2012a) (**Annexe 2**).

VIII.2.2. Influence du microenvironnement immunosuppresseur

Au diagnostic, les patients LMC présentent une fréquence accrue de cellules MDSC comparativement à des témoins sains, ces dernières représentant une population hétérogène de cellules immatures ayant des propriétés immunosuppressives. Elles expriment la protéine BCR-ABL et font parties du clone malin. Elles inhibent la cytotoxicité des CTL et des cellules NK et promeuvent le recrutement et l'expansion de LTreg qui favorisent l'échappement à la réponse immunitaire en inhibant les effecteurs LT CD4 et CD8 et la présentation antigénique (Giallongo et al., 2015; Giallongo C et al., 2014; Hughes A et al., 2017).

Il a été rapporté une fréquence accrue de LTreg au diagnostic de la maladie comparativement à des sujets sains : leur fréquence est supérieure en PA ou PB *versus* en PC ainsi que chez patients ayant un score Sokal de risque intermédiaire ou élevé *versus* de risque faible (Bachy et al., 2011; Hughes A et al., 2017; Zahran Am et al., 2014).

VIII.3. **Immunogénicité de la LMC**

Comme nous l'avons précédemment évoqué, la TK BCR-ABL est en soi faiblement immunogène ; cependant l'activation cellulaire et l'expression des gènes cibles qui découlent de son activité aboutissent à l'expression de LAA (pour antigènes associés aux leucémies) capables de déclencher une réponse T dirigée contre les cellules BCR-ABL⁺. Actuellement, seule l'immunothérapie de l'allogreffe de CSH est capable d'éradiquer la maladie *via* l'effet GVL qui met en jeu les réponses T et NK issues du greffon contre les antigènes mineurs du CMH (Yong AS, *Leukemia* (2008)) mais aussi contre les LAA (Qazilbash et al., 2017; Rezvani K et al., 2003; Yong As et al., 2011). L'efficacité des DLI (pour *donor lymphocyte infusions*)

étaye également l'efficacité de cet effet GVL. La présence de CTL dirigés contre PR3, un LAA, a été corrélée au succès thérapeutique de l'allogreffe de CSH. Il a également été mis en évidence le développement d'une réponse dirigée contre les antigènes WT1 et BMI-1 (Rezvani K et al., 2003; Yong As et al., 2011). Une activation efficace des LT spécifiques des LAA nécessite la présence d'une présentation *via* les molécules du CMH et la présence de molécules de costimulation. Les progéniteurs leucémiques CD34⁺ BCR-ABL⁺ échappent à l'immunité anti-leucémique en réduisant la densité des molécules du CMH de classe II à leur surface, ainsi que leur expression du facteur de transcription régulateur CIITA. Ce phénomène est dépendant d'une stimulation cytokinique relayée par la voie JAK/STAT, d'où la conduite de plusieurs essais cliniques testant des associations ITK et Ruxolitinib (un inhibiteur des TK JAK1 et JAK2) (NCT02253277, NCT01751425, and NCT01702064) (Nicolini, 2017; Tarafdar A et al., 2017).

VIII.4. Evolution de la réponse immunitaire sous traitement par ITK et effets immunomodulateurs des ITK

Après mise en route du traitement par ITK, une restauration de certaines anomalies du SI présentes au diagnostic est étayée par différentes études (Seggewiss et al., 2008). Il a été observé une restauration quantitative et qualitative des DC plasmacytoïdes et myéloïdes chez les patients traités par imatinib (Boissel N et al., 2004; Mohty et al., 2004). L'imatinib pourrait activer les cellules NK et les LT CD8 et, entraîner l'apoptose des LTreg (Balachandran Vp et al., 2011; Borg et al., 2004) *via* un effet immunomodulateur ou effet « *off-target* ». Plusieurs équipes ont montré une réduction de la fréquence des LTreg chez les patients traités par ITK (imatinib, nilotinib, ou dasatinib) (El Missiry M et al., 2016; Hayashi Y et al., 2012; Mustjoki et al., 2009; Qiu Zy et al., 2014; Zahran Am et al., 2014). Zahran *et al.* ont de plus montré une corrélation entre le niveau de réduction du compartiment LTreg et l'obtention ou non d'une DMR (Zahran Am et al., 2014). Une réduction du contingent des MDSC a été rapportée chez

les patients traités par imatinib et par dasatinib, laquelle s'accompagne d'une réduction de la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, IL-6, TGF- β). Ces données sont en faveur d'une réversion de l'environnement immunosuppressif présent au diagnostic sous l'effet des ITK (Christiansson et al., 2015).

Chen *et al.* ont mis en évidence des réponses CTL spécifiques de LAA chez la majorité des patients en rémission sous imatinib (Chen Ci et al., 2008). Hughes *et al.* ont montré un état de restauration d'immunosurveillance maximal chez les patients en DMR (patients en MR4.5 comparativement aux patients en MMR) avec une restauration quantitative et qualitative des cellules NK (cytotoxicité vis-à-vis des cellules K562), une diminution de la fréquence des LT CD4 et CD8 exprimant PD-1 et de la fréquence des MDSC myéloïdes. De plus, tandis que les réponses T spécifiques de LAA sont peu détectables chez les patients au diagnostic, on observe leur nette amplification chez les patients en MMR et MR4.5 lorsque la charge tumorale est réduite (Hughes A et al., 2017).

Mustjoki *et al.* ont étudié le phénotype des LT au sein du microenvironnement médullaire de 56 patients LMC-PC au diagnostic. Leurs résultats montrent une surexpression des marqueurs d'exhaustion PD-1, TIM3 et CTLA-4 par les LT CD4 et CD8 des patients comparativement aux témoins sains. Les paramètres biologiques présents au diagnostic qui sont associés à une plus faible probabilité d'obtention ultérieure sous ITK (82% imatinib, 11% dasatinib, 7% nilotinib) d'une DMR sont : une fréquence moindre de LT CD4, une fréquence accrue de LT CD8 PD-1⁺ TIM3⁺ et une fréquence élevée de PNN sanguins (Brück O et al., 2018).

Parmi les ITK, le dasatinib a des propriétés immunomodulatrices (effets *off-target*) singulières, le spectre des kinases ciblées par ce dernier est en effet différent de celui de l'imatinib, et du nilotinib. Il est capable d'induire, chez environ 30% des patients exposés, la présence de grands lymphocytes granuleux ou LGL correspondant à une expansion

oligoclonale de cellules NK et de LT CD8 dans le sang périphérique, ce phénomène étant corrélé à des meilleures réponses thérapeutiques et donc à un meilleur pronostic (Kim et al., 2009; Mustjoki S et al., 2009; Nagata Y et al., 2010).

Hayashi *et al.* ont rapporté une valorisation du potentiel cytolytique des cellules NK chez les patients traités par dasatinib comparativement à ceux traités par nilotinib ou imatinib, avec une augmentation de la fréquence des cellules NK matures CD56⁺ CD57⁺ (Hayashi Y et al., 2012). L'exposition au dasatinib est également associée à une diminution du pool de LTreg médullaire et sanguin (El Missiry M et al., 2016), cette dernière étant particulièrement marquée chez les patients avec LGL (Mustjoki S et al., 2009; Qiu Zy et al., 2014).

VIII.5. SI et arrêt du traitement dans la LMC

La recherche de biomarqueurs immunologiques prédictifs d'un succès d'arrêt du traitement par ITK concentre les efforts de recherche actuels. Deux équipes ont décrit chez les patients en succès d'arrêt une proportion accrue en périphérie de cellules NK de phénotype mature (CD57⁺ CD16⁺) responsable d'une polarisation des LT CD4 vers un profil de type Th1 (sécrétion de TNF- α et d'IFN- γ) (Ilander et al., 2016; Rea et al., 2017), tandis qu'une autre équipe a montré chez les patients en échec une fréquence accrue de DC plasmacytoïdes exprimant CD86, ligand du récepteur inhibiteur CTLA-4 capable d'entraîner une anergie des LT cytotoxiques (Schütz et al., 2017). Une association entre une proportion plus faible de LT régulateurs (CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}) et un succès d'arrêt du traitement a également été récemment rapportée (Imagawa et al., 2015). Bien que les LT conventionnels soient des acteurs clés de l'immunité antitumorale, aucune étude n'a établi de corrélation entre leur statut et une probabilité accrue de succès d'arrêt.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'objectif principal de ce travail de thèse est de montrer l'implication des LT CD8 innés (cellules T TCR- $\alpha\beta^+$ CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺) dans l'immunosurveillance antitumorale à travers le modèle physiopathologique de la LMC. Cela implique d'étudier leur statut au diagnostic de la maladie, leur évolution sous traitement par ITK ainsi que dans la situation dans laquelle le traitement est stoppé.

L'objectif secondaire de ce travail est de démontrer le caractère prédictif du statut numérique et/ ou fonctionnel des LT CD8 innés sur la probabilité de succès de l'arrêt du traitement par ITK dans la LMC, en lien avec les autres acteurs du SI notamment les cellules NK.

RÉSULTATS

PARTIE I - MANUSCRIT 1 : THE HYPOTHESIS OF THE HUMAN INKT/INNATE CD8(+) T-CELL AXIS APPLIED TO CANCER: EVIDENCE FOR A DEFICIENCY IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Florence Jacomet*, Emilie Cayssials*, Alice Barbarin, Deborah Desmier, Sara Basbous,

Lucie Lefèvre, Anaïs Levescot, Aurélie Robin, Nathalie Piccirilli, Christine

Giraud, François Guilhot, Lydia Roy, André Herbelin et Jean-Marc Gombert

*FJ et EC ont contribué de manière équivalente à ce travail

Frontiers in Immunology, Janvier 2017

Chez la souris, les iNKT sont requis pour la génération des LT CD8 « *innate memory* ». Nous avons précédemment mis en évidence des anomalies fonctionnelles des cellules iNKT au diagnostic de la LMC-PC. Nous avons identifié chez l'Homme adulte une nouvelle population de LT mémoires non conventionnels, les LT CD8 innés (cellules T TCR- $\alpha\beta^+$ CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺), dont les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles sont compatibles avec leur définition comme équivalent humain des LT CD8 « *innate memory* » murines. Nous avons ainsi postulé l'existence d'anomalies numériques et fonctionnelles des LT CD8 innés au diagnostic de la LMC-PC.

Dans cette première partie de notre travail (**Manuscrit 1**), nos résultats montrent une défaillance numérique des LT CD8 innés avec une baisse significative du niveau d'expression d'Eomes chez les patients LMC au diagnostic. Ce défaut de différenciation des LT CD8 innés s'accompagne de défaillances fonctionnelles :

- défaut d'expression de l'arsenal cytotoxique attesté par une diminution significative de la fréquence des LT CD8 innés exprimant la perforine,

- effondrement de la capacité d'expression de l'IFN- γ en réponse à la combinaison de cytokines pro-inflammatoires IL-12+IL-18,
- défaut de dégranulation dans un système de cytotoxicité redirigée dépendante de CD16,
- altération de la prolifération en réponse à l'IL-15.

Chez les patients obtenant une RCyC sous traitement par imatinib, nous avons observé une restauration numérique complète des LT CD8 innés. Sur le plan fonctionnel, leur potentiel cytotoxique, reflété par l'expression du marqueur de dégranulation CD107a, est complètement restauré tandis que leur capacité d'expression de l'IFN- γ en réponse à une stimulation de type inné n'est que partiellement restaurée. Nous avons, de plus, mis en évidence une corrélation positive entre l'expression de PLZF par les cellules iNKT et l'expression d'Eomes par les LT CD8 innés.

En conclusion, sur la base de nos précédents résultats concernant les iNKT au cours de la LMC et, de leur implication chez la souris dans la différenciation des LT CD8 « *innate memory* », nous avons postulé l'existence d'anomalies numériques et fonctionnelles des LT CD8 innés au diagnostic et une restauration chez les patients en rémission sous ITK. Nos résultats expérimentaux en confirmant notre hypothèse renforcent, d'une part le fait que les LT CD8 innés puissent représenter l'équivalent humain des LT CD8 « *innate memory* » décrits chez la souris et d'autre part, pose directement la question de leur potentielle implication dans le contrôle de la maladie à l'instar des iNKT.



The Hypothesis of the Human iNKT/Innate CD8(+) T-Cell Axis Applied to Cancer: Evidence for a Deficiency in Chronic Myeloid Leukemia

Florence Jacomet^{1,2,3,4*}, Emilie Cayssials^{1,3,4,5*}, Alice Barbarin^{1,3}, Deborah Desmier^{1,3,5}, Sara Basbous^{1,4}, Lucie Lefèvre^{1,4}, Anais Levescot¹, Aurélie Robin^{1,3}, Nathalie Piccirilli^{1,3}, Christine Giraud^{1,3,6}, François Guillhot^{3,4,7}, Lydia Roy^{7,8,9}, André Herbelin^{1,3,4†} and Jean-Marc Gombert^{1,2,3,4†*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Fernando A. Arosa,
University of Beira Interior, Portugal

Reviewed by:

Hyun Park,
National Cancer Institute, USA
Luc Van Kaer,
Vanderbilt University, USA

*Correspondence:

Jean-Marc Gombert
j.m.gombert@chu-poitiers.fr

†These authors have contributed
equally to this work.

†These authors have contributed
equally to this work as senior authors.

Specialty section:

This article was submitted
to T Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 16 November 2016

Accepted: 23 December 2016

Published: 16 January 2017

Citation:

Jacomet F, Cayssials E, Barbarin A, Desmier D, Basbous S, Lefèvre L, Levescot A, Robin A, Piccirilli N, Giraud C, Guillhot F, Roy L, Herbelin A and Gombert J-M (2017) The Hypothesis of the Human iNKT/Innate CD8(+) T-Cell Axis Applied to Cancer: Evidence for a Deficiency in Chronic Myeloid Leukemia. *Front. Immunol.* 7:688. doi: 10.3389/fimmu.2016.00688

¹INSERM 1082, Poitiers, France, ²Service d'Immunologie et Inflammation, Poitiers, France, ³CHU de Poitiers, Poitiers, France, ⁴Université de Poitiers, Poitiers, France, ⁵Service d'Hématologie et d'Oncologie Biologique, Poitiers, France, ⁶Établissement Français du Sang Centre-Atlantique, Site de Poitiers, Poitiers, France, ⁷INSERM CIC-1402, Poitiers, France, ⁸Service d'Hématologie Clinique, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France, ⁹Université Paris-Est, Créteil, France

We recently identified a new human subset of NK-like [KIR/NKG2A(+)] CD8(+) T cells with a marked/memory phenotype, high Eomesodermin expression, potent antigen-independent cytotoxic activity, and the capacity to generate IFN- γ rapidly after exposure to pro-inflammatory cytokines. These features support the hypothesis that this new member of the innate T cell family in humans, hereafter referred to as innate CD8(+) T cells, has a role in cancer immune surveillance analogous to invariant natural killer T (iNKT) cells. Here, we report the first quantitative and functional analysis of innate CD8(+) T cells in a physiopathological context in humans, namely chronic myeloid leukemia (CML), a well-characterized myeloproliferative disorder. We have chosen CML based on our previous report that IL-4 production by iNKT cells was deficient in CML patients at diagnosis and considering the recent evidence in mice that IL-4 promotes the generation/differentiation of innate CD8(+) T cells. We found that the pool of innate CD8(+) T cells was severely reduced in the blood of CML patients at diagnosis. Moreover, like iNKT and NK cells, innate CD8(+) T cells were functionally impaired, as attested by their loss of antigen-independent cytotoxic activity and IFN- γ production in response to innate-like stimulation with IL-12 + IL-18. Remarkably, as previously reported for IL-4 production by iNKT cells, both quantitative and functional deficiencies of innate CD8(+) T cells were at least partially corrected in patients having achieved complete cytogenetic remission following tyrosine kinase inhibitor therapy. Finally, direct correlation between the functional potential of innate CD8(+) T and iNKT cells was found when considering all healthy donors and CML patients in diagnosis and remission, in accordance with the iNKT cell-dependent generation of innate CD8(+) T cells reported in mice. All in all, our data demonstrate that CML is associated

with deficiencies of innate CD8(+) T cells that are restored upon remission, thereby suggesting their possible contribution to disease control. More generally, our study strongly supports the existence of an innate iNKT/innate CD8(+) T-cell axis in humans and reveals its potential contribution to the restoration of tumor immune surveillance.

Keywords: innate CD8(+) T cells, NK-like CD8(+) T cells, iNKT cells, chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitor

INTRODUCTION

A hallmark of the antigen-specific T lymphocytes of the adaptive immune system is their capacity to "remember" foreign pathogens long after they are first encountered. Indeed, as far as the CD8 T cell pool is concerned, the main features that provide antigen-specific memory CD8(+) T cells with a protective advantage over naive CD8+ T cells are that memory CD8+ T cells persist for extended periods of time, are present in larger numbers, and respond more rapidly to foreign antigen than naive CD8(+) T cells do. However, studies in mice have provided clear evidence that some naive CD8(+) T cells can acquire the characteristics and functions of memory CD8(+) T cells in the absence of foreign antigen encounters [reviewed in Ref. (1, 2)]. Such cells, hence called innate/memory CD8(+) T cells, may develop in response to alterations in the environment or the presence of high levels of the cytokine IL-4, and have also been identified in unmanipulated animals. A hallmark of innate/memory CD8(+) T cells is their marked NK-like/memory phenotype associated with pronounced expression of the transcription factor eomesodermin (Eomes) (3, 4). Even though the actual physiological significance of innate/memory CD8(+) T cells remains to be established, these cells have enhanced response potential, including the ability to efficiently combat pathogens (5, 6). Moreover, because these cells can rapidly produce large amounts of IFN- γ in response to innate-like stimulation by IL-12 + IL-18 (7, 8), they might contribute to the inflammation milieu during an early stage of immune response.

The existence of innate/memory CD8(+) T cells in mice raises the question whether an equivalent to these innate T cells exists in humans. Earlier studies identified a subset of CD8(+) T cells in human peripheral blood that express NK-cell receptors such as killer cell Ig-like receptors (KIRs) (9–11). We further demonstrated that the majority of KIR/NKG2A(+) CD8(+) T cells have a memory phenotype and share functional and phenotypic features (12), see commentary (13): with innate/memory T CD8(+) cells in mice (3, 4, 7, 8). Indeed, they express high levels of Eomes and display innate functions, such as cytolytic capacity and rapid TCR-independent IFN- γ production in response to the innate cytokines IL-12 and IL-18. Regardless of their origin, KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells harboring memory phenotype and innate-like functions have also been identified in human cord blood, suggesting that their development did not depend on cognate antigens. Additionally, the presence of these cells correlated well with expression of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) among NKT cells in cord blood, a finding that is consistent with the hypothesis of a contribution of IL-4-producing, PLZF-expressing cells to their generation, as reported for their equivalents in mice

(14, 15). These features validate the existence of a new member of the innate T cell family in humans, which we have termed innate CD8(+) T cells. However, to date, even though evidence accounts for their potential physiological relevance, whether innate CD8(+) T cells can mediate potent immunity in humans remains to be investigated.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a well-characterized myeloproliferative disorder, which results from dysregulated tyrosine kinase (TK) activity of the fusion oncoprotein BCR-ABL (16). Imatinib mesylate (IM), a competitive inhibitor of the BCR-ABL TK activity, is currently used as a first-line therapy for newly diagnosed patients in the chronic phase (CML-CP) (17). Overall, TK inhibitor (TKI) therapies have led to deep molecular responses in CML, dramatically improved life expectancy, and more recently, successful treatment-free survival has become a new goal (18). However, a significant proportion of patients will not fulfill the conditions allowing for treatment discontinuation while more than 40% of those eligible for treatment discontinuation relapse during the first 6 months after therapy cessation. Additional therapeutic strategies aiming at a potentiation and/or restoration of immune antitumor functions, therefore, remain a main avenue of research, which may be helpful in long-term control of CML.

A sizable number of clinical and experimental data underscore the dysregulation of innate immune components in CML. These regulatory elements comprise dendritic cells (19), NK cells (20, 21), and invariant natural killer T (iNKT) cells (22), an innate T cell subset co-expressing activated/memory and NK markers, which is well-recognized for its antitumor activity (23–26). In accordance with this notion, we recently reported CML immune subversion of iNKT-cell activities in CML patients at diagnosis (22, 27), including reduced or suppressed expression of perforin, CD95L, and (PLZF), a transcription factor required for maintenance of iNKT cell functions (28, 29). Remarkably, these functional deficiencies were shown to have been partially repaired in patients having achieved complete cytogenetic remission (CCyR) following TKI therapy (22).

In mice, IL-4-producing/PLZF-expressing cells, including iNKT cell, have been demonstrated to regulate the generation of innate/memory CD8(+) T cells (14, 15). Considering the functional deficiencies of iNKT cells in CML-CP patients at diagnosis and the fact that IL-4 production by iNKT cells was partially restored in patients having achieved CCyR after TKI therapy (22), we surmised that innate CD8(+) T cells might also be altered during CML and be restored in CML patients with CCyR. We further attempted to correlate the presence of innate CD8(+) T cells with that of iNKT cells to estimate the possible implication in humans of the peripheral iNKT cell pool in the development of its CD8(+) T-cell counterpart.

MATERIALS AND METHODS

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

Venous blood from CML-CP patients at diagnosis or having achieved a major molecular response and currently treated with IM (CML-IM) was collected on heparin (Oncology-Hematology Department, Poitiers, France). All patients gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki for participation in the study, which was approved by the scientific committee of the INSERM CIC-1402 (Poitiers, France). Healthy donors (HDs) were volunteers from the Pôle Biologie Santé (Poitiers, France). PBMCs were isolated from blood samples by density gradient centrifugation (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich), resuspended in 90% fetal calf serum with 10% DMSO, and placed in a controlled rate freezer for cryopreservation at -80°C until use.

Cell Culture and Functional Assays

All cell cultures (1×10^6 cells/mL) were performed in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS and antibiotics. For IL-12 + IL-18 stimulation, PBMCs from HD or CML patients were seeded at 1×10^6 cells/mL into 24-well plates and incubated for 48 h with 20 ng/mL of each cytokine (R&D Systems). Golgistop (BD Biosciences) was added for the last 5 h of culture. CD107a degranulation assays were performed as previously described (12). Briefly, PBMCs were seeded into 96-well round (U) bottom culture plates, preincubated for 48 h with IL-15 (20 ng/mL, R&D Systems) prior to CD16 triggering, and Golgistop (BD Biosciences) was added in the last 4 h of culture. For IL-4 stimulation, PBMCs from HDs were seeded at 0.5×10^6 cells/mL into 24-well plates and incubated for 7 days with 20 ng/mL of recombinant human IL-4 (R&D Systems).

Flow Cytometry

Phenotypic analysis of PBMCs was performed by flow cytometry either *ex vivo* or after culture. Expression of different markers was assessed by staining with appropriate combinations of the following antibodies (mAbs): anti-CD3 BV421 (clone: UCHT1, BioLegend), anti-CD8 PE-Cy7 (clone: RPA-T8, Biolegend), anti-IFN- γ FITC (clone: B27, BioLegend), anti-perforin FITC (clone: 8G9, BD Biosciences), anti-TCR V α 24-J α 18 APC (clone: 6B11, Biolegend), anti-CD107a FITC (clone H4A3, BD Biosciences), anti-Eomes eFluor® 660 (clone: WD1928, eBiosciences), and anti-PLZF PE (clone: Mags.21F7, eBioscience). Pan-KIR/NKG2A referred to staining with the mix of the three following antibodies from Miltenyi Biotec: anti-KIR2D PE (clone: NKVFS1), anti-KIR3DL1/KIR3DL2 (CD158e/k) PE (clone: 5.133), and anti-NKG2A (CD159a) PE (clone: REA110). Dead cells were excluded by using the Live/Dead® Fixable Near-IR Dead Cell Stain kit (Life Technologies). For nuclear Eomes or PLZF staining and intracytoplasmic IFN- γ or perforin staining, cells were permeabilized with an anti-human Foxp3 staining kit (eBioscience) and a Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences), respectively. Cells were analyzed by eight-color flow cytometry (FACSVerse™ cytometer and FACSsuite™ software, BD Biosciences) and were analyzed using FlowJo v10 (TreeStar, Inc.). Innate CD8(+) T cells

are defined as CD3(+) CD8(+) Eomes(+) KIR/NKG2A(+) and iNKT cells as CD3(+) TCRV α 24-J α 18(+) expressing cells after gating on live PBMCs.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software). The statistical significance of differences in mean values was analyzed by the Mann-Whitney or Wilcoxon non-parametric test. The correlation Spearman test was used to test the association between the ranked variables Eomes and PLZF. Results were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

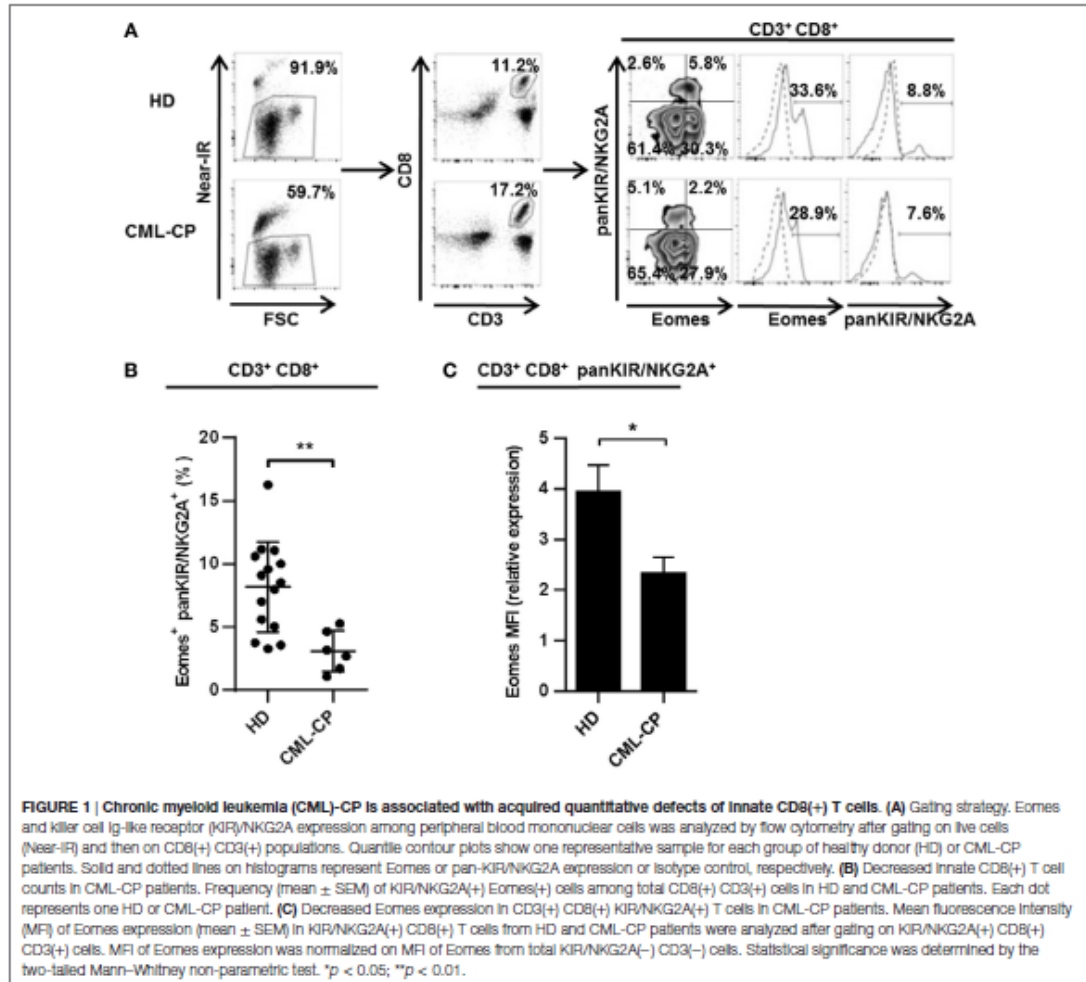
Quantitative and Functional Deficiencies of Innate CD8(+) T Cells from CML-CP Patients

CD8(+) T cells co-expressing Eomes and KIR/NKG2A represent a new, functionally distinct "innate" subset in humans, with potential antitumor activities (12, 13). Based on our evidence for CML immune subversion of iNKT-cell activities (22, 27), we first investigated possible dysfunctions of this new innate CD8 T subset (for gating strategy, see Figure 1A) in CML patients at diagnosis (CML-CP). As depicted in Figure 1B, the frequency of KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells was more than 2.5-fold lower in CML-CP patients ($3.1\% \pm 0.7$; $n = 6$) than in HDs ($8.2\% \pm 0.9$; $n = 15$).

Note that both the proportion of cells expressing Eomes among the KIR/NKG2A(+) CD8(+) T cell subset (Figure S1 in Supplementary Material) and the expression levels (Figure 1C) were significantly reduced in CML-CP patients [frequency: $26.3\% \pm 3.2$ ($n = 6$) and mean fluorescence intensity (MFI): 2.17 ± 0.25 ($n = 6$), respectively] as compared to HD [frequency: $46.5\% \pm 4.6$ ($n = 14$) and MFI: 3.95 ± 0.52 ($n = 15$), respectively]. Taken together, these data are consistent with impaired differentiation of the innate CD8 T cell subset in CML-CP patients.

We have previously reported (12) and have confirmed in our present HD cohort (Figure 2A) that the rapid production of IFN- γ in response to innate-like stimulation by IL-12 + IL-18 constitutes a unique hallmark of innate CD8(+) T cells. Indeed, this functional reactivity to IL-12 + IL-18 was found in the innate KIR/NKG2A(+) Eomes(+) fraction ($24.8\% \pm 1.2$; $n = 6$) and not in the conventional/memory KIR/NKG2A(-) Eomes(+) pools of CD8(+) T cells ($1.4\% \pm 0.8$; $n = 6$).

Remarkably, this function was not maintained in innate CD8(+) T cells from CML-CP patients, in which IL-12 + IL-18-induced intracellular IFN- γ expression was virtually undetectable [$0.7\% \pm 0.1$ ($n = 6$) vs. $0.4\% \pm 0.02$ ($n = 5$) in their conventional/memory counterpart], as compared with HD ($24.8\% \pm 1.2$ ($n = 6$) vs. $1.4\% \pm 0.8$ ($n = 6$) in their conventional/memory counterpart) (Figure 2A). In HD, innate CD8(+) T cells express more cytolytic activity than does their conventional/memory [KIR/NKG2A(-) Eomes(+)] CD8(+) counterpart, as attested by their more elevated perforin expression [$71.4\% \pm 5.3$ ($n = 10$)



and 42.4% ± 9.1 (n = 6), respectively] (Figure 2B), and natural antibody-dependent cytotoxicity through CD16 as a lysis receptor [26.4% ± 6.2 (n = 6) and 11.4% ± 3.5 (n = 6), respectively] (Figure 2C).

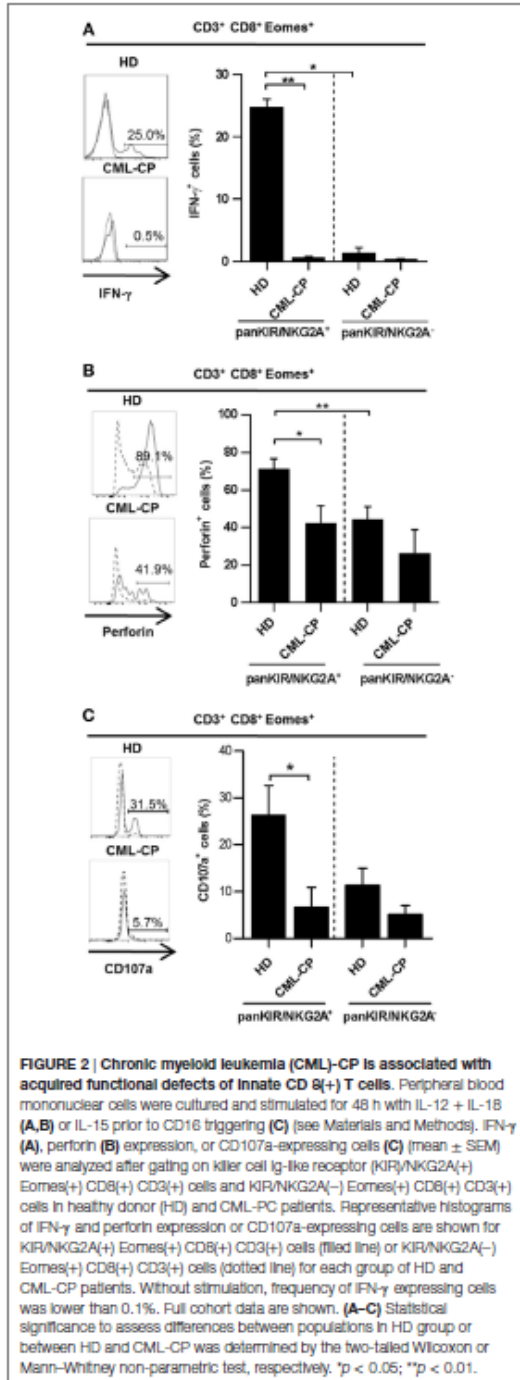
As for intracellular IFN-γ expression, these two functions were once again dramatically reduced in innate CD8(+) T cells from CML-CP patients [44.0 ± 6.7% (n = 10) and 6.8% ± 4.1 (n = 5), respectively] all the way down to the levels found in the conventional/memory population [26% ± 13 (n = 6) and 5.1% ± 1.9 (n = 5), respectively] (Figures 2B,C).

Finally, both IFN-γ after IL-12 + IL-18 stimulation and cytolytic activity of classical NK cells were likewise decreased in CML-CP patients [7.0% ± 2.0 (n = 8) and 34.3% ± 11.5 (n = 5), respectively] as compared to HD [25.8% ± 3.9 (n = 15) and 65.9% ± 8.1 (n = 6), respectively] (Figure S2 in Supplementary

Material). These findings, together with the similar frequencies of IFN-γ-expressing innate CD8(+) T cells, upon TCR engagement in HD (7.8% ± 6.4; n = 7) and CML-CP patients (9.1% ± 2.3; n = 7) (Figure S3 in Supplementary Material), would appear to imply that the functional deficiencies of innate CD8(+) T cells in CML-CP patients affect innate rather than adaptive immune responses.

Partial Correction of Quantitative and Functional Deficiencies of Innate CD8(+) T Cells in Patients with CCyR

In patients having achieved complete cytogenetic remission following IM therapy, referred to as CML-IM patients, we observed a recovery of innate CD8(+) T cells (Figure 3A, left



panel) in CML-IM patients ($5.4\% \pm 0.5$; $n = 6$ vs. $2.3\% \pm 0.6$; $n = 7$ in CML-CP patients), back close to the proportions found in HD ($7.8\% \pm 0.9$; $n = 16$), while Eomes expression (Figure 3A, right panel) was increased in CML-IM patients (MFI: 2.5 ± 0.5 ; $n = 6$) as compared with CML-CP patients (1.4 ± 0.2 ; $n = 7$) and was partially restored relative to HD (MFI: 4.0 ± 0.5 ; $n = 16$). Accordingly, the proportion of cells expressing Eomes in the KIR/NGK2A(+) CD8 T cell subset was restored in CML-IM patients ($42.7\% \pm 2.9$; $n = 6$) as compared with CML-CP patients ($26.3\% \pm 3.2$; $n = 6$), reverting to the proportions found in HD ($46.5\% \pm 4.6$; $n = 14$) (Figure S1 in Supplementary Material).

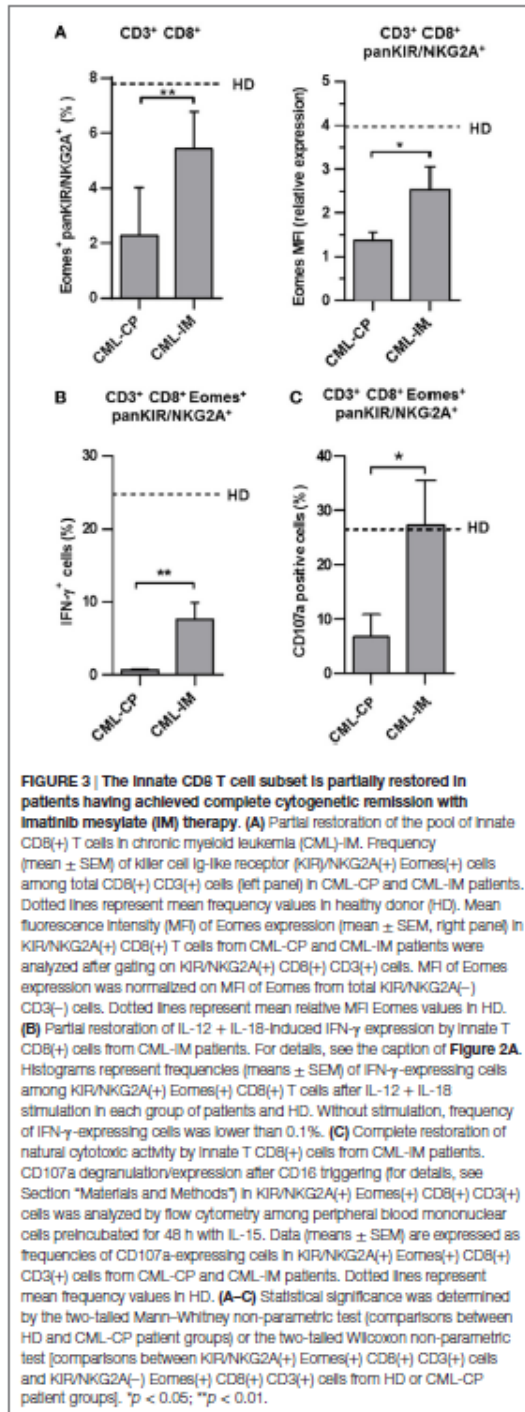
Importantly, in these conditions, IFN- γ expression in response to IL-12 + IL-18 was partially restored in the innate CD8(+) T cell compartment from CML-IM patients ($7.7\% \pm 2.3$; $n = 6$ vs. $0.7\% \pm 0.1$; $n = 5$ in CML-CP patients) relative to HD ($24.8\% \pm 1.2$; $n = 6$) (Figure 3B), while cytolytic activity, measured as frequencies of CD107a-expressing cells in KIR/NGK2A(+) Eomes(+) CD8(+) CD3(+) cells, returned to normal ($27.3\% \pm 8.3$; $n = 6$ vs. $6.8\% \pm 4.1$; $n = 5$ in CML-CP patients), relative to HD ($26.4\% \pm 6.2$; $n = 6$) (Figure 3C).

Positive Correlation between iNKT Cell PLZF Expression and Innate CD8(+) T Cell Eomes Expression

We have previously reported that IL-4 production by iNKT cells returned to normal in patients having achieved complete CML remission with TKI therapy (22). Given that, in mice, the differentiation of innate CD8(+) T cells depends mainly on PLZF-expressing iNKT cells via their IL-4 production (14, 15); we reasoned that the same phenomenon might be applied to humans. In accordance with this notion, we found a significant positive correlation between the levels of Eomes in KIR/NGK2A(+) CD8(+) T cells and of PLZF in iNKT cells including all the HD, CML-CP, and CML-IM samples available (Figure 4A). Moreover, we found that after 7 days of culture in the presence of IL-4, recovery of CD8(+) T cells was slightly, but significantly, increased both in terms of frequency and numbers as compared to the total CD3(+) CD8(+) cells (Figures 4B,C). We also confirmed in humans that IL-4 strongly enhances Eomes expression both in total CD3(+) CD8(+) cells and in innate CD8(+) T cells (Figure 4D). Taken together, these findings support the possible involvement of iNKT cells through their IL-4 production in the generation/maintaining of innate CD8(+) T cells in CML patients.

DISCUSSION

Although the concept of innate memory CD8(+) T cells is now well established in mice, whether an equivalent T-cell population exists in humans remains under debate. We recently reported that CD8(+) T cells co-expressing Eomes and KIR/NGK2A may represent a new, functionally distinct innate T cell subset in humans. Here, by extending our study to CML, we report that this disease is associated with an acquired and reversible defect of innate CD8(+) T cells. To the best of our knowledge,



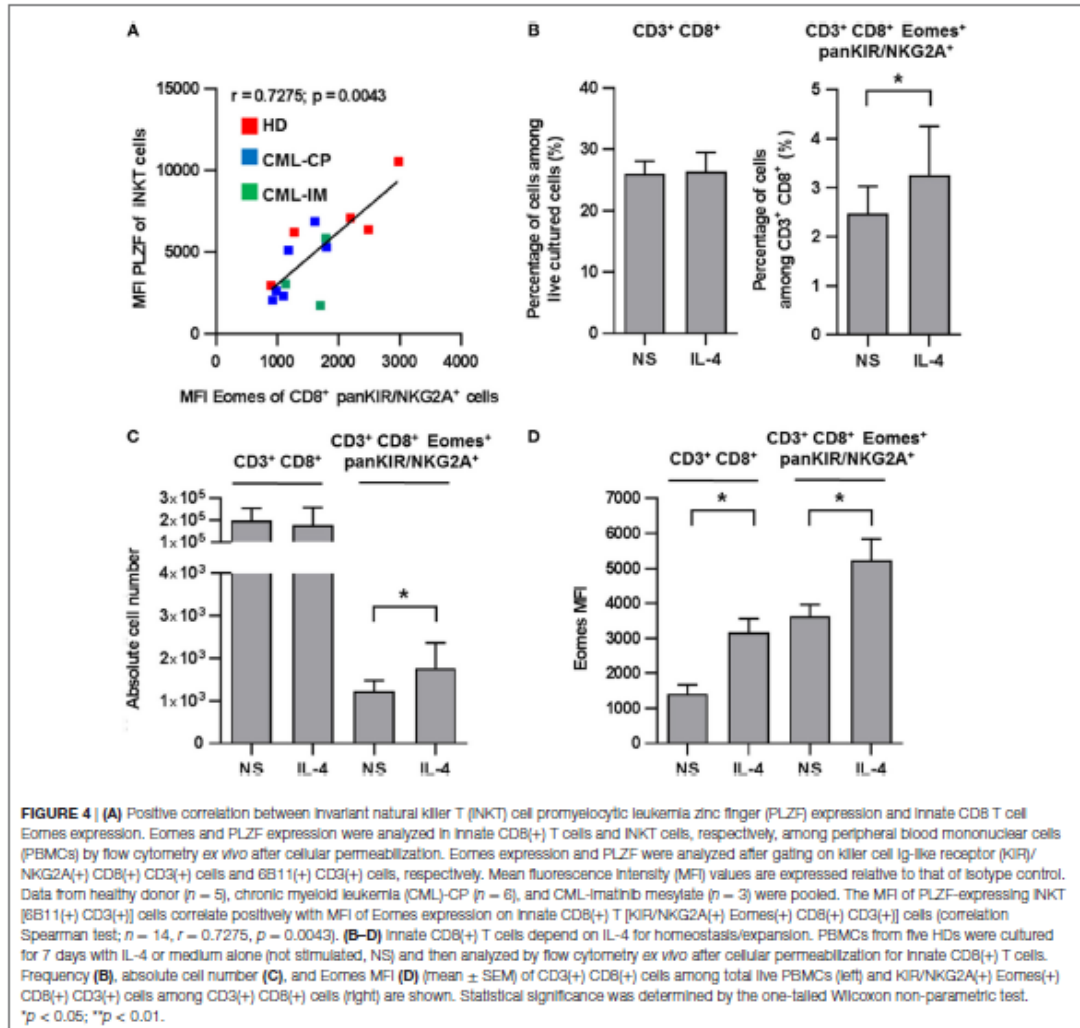
these findings are the first providing insights into the potential role of innate CD8(+) T cells in a physiopathological context in humans.

The finding that CML, at diagnosis is closely associated with a profound quantitative and functional deficiency in the innate CD8(+) T cell pool is in line with our hypothesis that this new subset may be involved during tumorigenesis in humans. This assumption was earlier based on our demonstration of terminally differentiated effector features of innate CD8(+) T cells in humans, such as rapid production of IFN- γ and induction of cytolytic function upon stimulation *in vitro*. In the present study, our revelation of the profound impact of CML on these potential antitumoral functions of innate CD8(+) T cells, together with those of NK (see Figure S2 in Supplementary Material) and iNKT cells (22, 27), support a role in cancer immune surveillance of innate CD8(+) T cells analogous to the two other innate cell pools. Even though these findings corroborate the concept that innate CD8(+) T cells, like iNKT cells, may act against tumors in a TCR-independent and NK-like manner, the possibility that these cells recognize leukemia cells cannot be excluded and deserves further investigation.

Remarkably, deficiencies of innate CD8(+) T cells found at diagnosis in CML patients were significantly reversed upon remission following TKI therapy. These data are consistent with the hypothesis that reconstitution of the pool of innate CD8(+) T cells and its partial functional restoration together with those of NK cells and iNKT cells effectively contribute to disease control of CML during TKI therapy. To definitively confirm this assumption, it will be important to further evaluate whether the emergence of innate CD8(+) T cells in terms of both number and functional potential is closely related to long-term remission after treatment discontinuation.

To date, in mice, even though the effector functions of innate/memory CD8(+) T cells have been extensively tested *in vitro*, their actual role during immune responses remains poorly documented. Testing the *in vivo* response following infection with the bacteria *Listeria monocytogenes*, innate/memory CD8(+) T cells were found to have a protective function (5, 6). As far as immune responses against tumors are concerned, only in lymphodepleted mice, does there exist evidence that these cells can enhance response to tumors (30–33). Given our findings, it remains to be directly determined, using experimental tumor models in mice, whether or not innate CD8(+) T cells exert protective functions.

The precise mechanisms for the generation and/or maintenance of innate CD8(+) T cells in humans remain to be determined. In the mouse, a key role in Eomes upregulation has been attributed to PLZF-expressing T cells. Similarly, our data in peripheral blood show a close correlation between the levels of Eomes in innate CD8(+) T cells and of PLZF in iNKT cells. Moreover, expression of PLZF and Eomes in iNKT cells and innate CD8(+) T cells, respectively, were both found to be reduced in patients at CML diagnosis, and reversed after disease remission, as were innate CD8(+) T cells in terms of both number and functions. Taken together, these findings are consistent with the existence of a PLZF-dependent mechanism in humans, similar to that reported in mice. It remains to



determine whether, as in mice, PLZF-expressing T cells, especially iNKT cells, promote the development of blood peripheral innate T CD8(+) T cells by providing IL-4. In accordance with this view, we recently demonstrated a functional deficiency of IL-4 production by iNKT cells in CML patients at diagnosis and its partial restoration in patients having achieved remission after TKI therapy (22).

Further investigations are required to elucidate the exact mechanisms accounting for the deficiency of innate CD8(+) T cells at diagnosis and the beneficial effect of TKI therapy on this pool of cells. Nonetheless, from our data, it is tempting to speculate that the dysfunctions of innate CD8(+) T cells in CML

patients at diagnosis that are remedied by TKI therapy originate from antigen APC-dependent dysfunctions, which in turn might contribute to iNKT cell deficiencies. This hypothesis arises from our recent findings showing that BCR-ABL from CML myeloid DCs mediates iNKT-cell immune subversion by downregulating cell-surface CD1d expression (27). Another non-exclusive mechanism may involve IL-15, which is required for maintenance not only of conventional memory CD8(+) T cells (34, 35) but also innate/memory CD8(+) T cells (32, 36). Indeed, CD8 α (+) DC trans-presentation of IL-15 contributes to development of innate-like CD8(+) T cells in the periphery (37). For these reasons, the possible existence of a deficit in IL-15 expression and/or in IL-15

trans-presentation by mDCs from CML-CP patients is deserving of special attention.

All in all, by revealing an iNKT/innate CD8(+) T-cell axis with expected physiopathological relevance in CML, our findings should enhance understanding of the T cell components restored in CML treatment that contribute to disease control. From a more general standpoint, our study underscores the potential role of innate CD8(+) T cells against tumors in conjunction with iNKT cells and may contribute significantly to our understanding of the role of these innate T cell subsets in the development of protective immunity in humans.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FJ, EC, and AB designed the experiments, performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. DD, AL, and SB designed the experiments, performed the experiments, and analyzed and interpreted the data. AR, NP, and LL provided assistance with cell cultures. CG contributed to PBMC preparation from patients and healthy controls. FG and LR provided clinical samples and contributed to the interpretation of data. AH and J-MG together were responsible for the overall study design, supervised the project, and took primary responsibility for writing the manuscript.

REFERENCES

- Lee YI, Jameson SC, Hogquist KA. Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends Immunol* (2011) 32(2):50–6. doi:10.1016/j.it.2010.12.004
- Jameson SC, Lee YI, Hogquist KA. Innate memory T cells. *Adv Immunol* (2015) 126:173–213. doi:10.1016/bs.ai.2014.12.001
- Akue AD, Lee J-Y, Jameson SC. Derivation and maintenance of virtual memory CD8 T cells. *J Immunol* (2012) 188(6):2516–23. doi:10.4049/jimmunol.1102213
- Lee J-Y, Hamilton SE, Akue AD, Hogquist KA, Jameson SC. Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110(33):13498–503. doi:10.1073/pnas.1307572110
- Hamilton SE, Wolkers MC, Schoenberger SR, Jameson SC. The generation of protective memory-like CD8+ T cells during homeostatic proliferation requires CD4+ T cells. *Nat Immunol* (2006) 7(5):475–81. doi:10.1038/ni1326
- Hamilton SE, Jameson SC. The nature of the lymphopenic environment dictates protective function of homeostatic-memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(47):18484–9. doi:10.1073/pnas.0806487105
- Hu J, Sahu N, Walsh E, August A. Memory phenotype CD8+ T cells with innate function selectively develop in the absence of active T_H1. *Eur J Immunol* (2007) 37(10):2892–9. doi:10.1002/eji.200737311
- Haluszcak C, Akue AD, Hamilton SE, Johnson LDS, Pujanauski L, Teodorovic I, et al. The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J Exp Med* (2009) 206(2):435–48. doi:10.1084/jem.20081829
- Björkström NK, Béziat V, Cichocki F, Liu LL, Levine J, Larsson S, et al. CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. *Blood* (2012) 120(17):3455–65. doi:10.1182/blood-2012-03-416867
- Huard B, Karlsson L. A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur J Immunol* (2000) 30(6):1665–75. doi:10.1002/1521-4141(200006)30:6<1665::AID-IMMU1665>3.0.CO;2-2
- van der Veken LT, Diez Campelo M, van der Hoorn MA, Hagedoorn RS, van Egmond HM, van Bergen J, et al. Functional analysis of killer Ig-like receptor-expressing cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* (2009) 182(1):92–101. doi:10.4049/jimmunol.182.1.92

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of M. Charron (Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Site de Poitiers, Poitiers). The authors are especially indebted to E. Schneider for critically reviewing the manuscript of which the English was reviewed by Jeffrey Arsham, an American medical translator. They thank Image UP (Université de Poitiers) flow cytometry core facilities.

FUNDING

This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer du Grand Ouest (Comités départementaux de la Vienne, de la Charente, de la Charente Maritime et des Deux-Sèvres), Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes (ARIM-PC), Association Laurette Fugain, Ministère de la Recherche, Sport & Collection, and INCA-DGOS 8658 (PRT-K 2015-052).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00688/full#supplementary-material>.

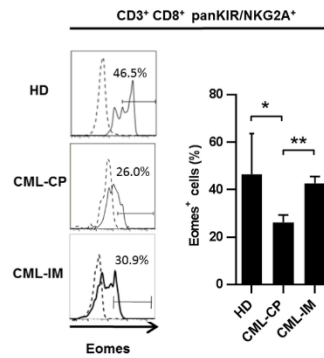
- Jacomet F, Cayssials E, Babous S, Levescot A, Piccirilli N, Desmier D, et al. Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. *Eur J Immunol* (2015) 45(7):1926–33. doi:10.1002/eji.201545539
- Van Kaer L. Innate and virtual memory T cells in man. *Eur J Immunol* (2015) 45(7):1916–20. doi:10.1002/eji.201545761
- Verykokakis M, Boos MD, Bendelac A, Kee BL. SAP protein-dependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(+) T cells with innate lymphocyte characteristics. *Immunity* (2010) 33(2):203–15. doi:10.1016/j.immuni.2010.07.013
- Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nat Immunol* (2010) 11(8):709–16. doi:10.1038/ni.1898
- Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* (2003) 349(15):1451–64. doi:10.1056/NEJMra020777
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* (2006) 355(23):2408–17. doi:10.1056/NEJMoa062867
- Burchert A, Saussele S, Eigendorff E, Müller MC, Sohlbach K, Inselmann S, et al. Interferon alpha 2 maintenance therapy may enable high rates of treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* (2015) 29(6):1331–5. doi:10.1038/leu.2015.45
- Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, Marelli-Berg F, Dazzi F, Simpson E, et al. Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* (2003) 101(9):3560–7. doi:10.1182/blood-2002-06-1841
- Chen CI, Koschmieder S, Kerstiens I, Schemionek M, Altwater B, Pscherer S, et al. NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. *Leukemia* (2012) 26(3):465–74. doi:10.1038/leu.2011.239
- Chiorean EG, Dylla SJ, Olsen K, Lemvik T, Soignier Y, Miller JS. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). *Blood* (2003) 101(9):3527–33. doi:10.1182/blood-2002-04-1172
- Rosignol A, Levescot A, Jacomet F, Robin A, Babous S, Giraud C, et al. Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic

- myeloid leukemia patients. *Eur J Immunol* (2012) 42(7):1870–5. doi:10.1002/eji.201142043
23. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* (2011) 11(2):131–42. doi:10.1038/nri2904
 24. Fujii S-I, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, et al. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front Immunol* (2013) 4:409. doi:10.3389/fimmu.2013.00409
 25. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Brown J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the “Swiss-Army knife” of the immune system. *Curr Opin Immunol* (2008) 20(3):358–68. doi:10.1016/j.coi.2008.03.018
 26. Macho-Fernandez E, Brigl M. The extended family of CD1d-restricted NKT cells: sifting through a mixed bag of TCRs, antigens, and functions. *Front Immunol* (2015) 6:362. doi:10.3389/fimmu.2015.00362
 27. Basbous S, Levescot A, Piccirilli N, Brizard F, Guilhot F, Roy L, et al. The Rho-ROCK pathway as a new pathological mechanism of innate immune subversion in chronic myeloid leukaemia. *J Pathol* (2016) 240(3):262–8. doi:10.1002/path.4779
 28. Savage AK, Constantinides MG, Han J, Picard D, Martin E, Li B, et al. The transcription factor *PLZF* directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* (2008) 29(3):391–403. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.011
 29. Kovalovsky D, Uche OU, Eladad S, Hobbs RM, Yi W, Alonzo E, et al. The BTB-zinc finger transcriptional regulator, *PLZF*, controls the development of iNKT cell effector functions. *Nat Immunol* (2008) 9(9):1055–64. doi:10.1038/ni.1641
 30. Dummer W, Niethammer AG, Baccala R, Lawson BR, Wagner N, Reisfeld RA, et al. T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. *J Clin Invest* (2002) 110(2):185–92. doi:10.1172/JCI0215175
 31. Ha H-M, Poehlein CH, Urba WJ, Fox BA. Development of antitumor immune responses in reconstituted lymphopenic hosts. *Cancer Res* (2002) 62(14):3914–9.
 32. Li Q, Rao RR, Araki K, Pollizzi K, Odunsi K, Powell JD, et al. A central role for mTOR kinase in homeostatic proliferation induced CD8+ T cell memory and tumor immunity. *Immunity* (2011) 34(4):541–53. doi:10.1016/j.immuni.2011.04.006
 33. Wang L-X, Li R, Yang G, Lim M, O'Hara A, Chu Y, et al. Interleukin-7-dependent expansion and persistence of melanoma-specific T cells in lymphodepleted mice lead to tumor regression and editing. *Cancer Res* (2005) 65(22):10569–77. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2117
 34. Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* (2003) 3(4):269–79. doi:10.1038/nri1052
 35. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* (2008) 29(6):848–62. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.002
 36. Sandau MM, Winstead CJ, Jameson SC. IL-15 is required for sustained lymphopenia-driven proliferation and accumulation of CD8 T cells. *J Immunol* (2007) 179(1):120–5. doi:10.4049/jimmunol.179.1.120
 37. Sosinowski T, White JT, Cross EW, Haluszczak C, Marrack P, Gapin L, et al. CD8 α + dendritic cell trans presentation of IL-15 to naive CD8+ T cells produces antigen-inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function. *J Immunol* (2013) 190(5):1936–47. doi:10.4049/jimmunol.1203149

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

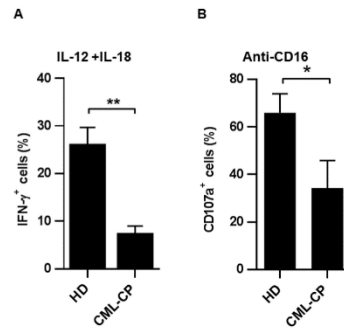
Copyright © 2017 Jacomet, Cayssials, Barbarin, Desmier, Basbous, Lefèvre, Levescot, Robin, Piccirilli, Giraud, Guilhot, Roy, Herbelin and Gombert. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplemental Figure 1



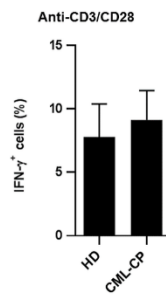
Supplemental Figure 1. Frequency of Eomes-expressing cells among KIR/NKG2A(+) CD8(+) T cells from HD, CML-CP and CML-IM patients. Eomes expression was analyzed after gating on KIR/NKG2A(+) CD8(+) CD3(+) cells. PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed and permeabilized, and then stained with anti-Eomes-AF647. Left panel: Histogram overlays show one representative sample for each group of HD, CML-CP and CML-IM patients. Right panel: Cohort results. Histograms show frequency of Eomes(+) cells among KIR/NKG2A(+) CD8(+) T cells for each group of HD, CML-CP and CML-IM patients. Statistical significance was determined by the Mann Whitney non-parametric test. * $p < 0.05$.

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2. Perforin expression and natural cytotoxic activity of NK cells from HD and CML-CP patients. (A) Defective IFN- γ expression by KIR/NKG2A(+) CD3(-) cells from CML-CP patients in response to innate-like stimulation. PBMCs were cultured for 48 hours with IL-12+IL-18 (20 ng/mL together, R&D Systems). PBMCs were then membrane-labeled with anti-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed, permeabilized, and stained with anti-Eomes-AF64 and anti-IFN- γ -FITC. IFN- γ expression was analyzed after gating on KIR/NKG2A(+) CD3(-) cells. Histograms represent frequencies (means \pm SEM) of IFN- γ -expressing cells after IL-12+IL-18 stimulation among KIR/NKG2A(+) CD3(-) cells from HD and CML-CP patients. Full cohort data are shown. **(B) Defective natural cytotoxic activity in KIR/NKG2A(+) CD3(-) cells from CML-CP patients.** PBMCs were preincubated for 48 hours with IL-15 (20 ng/mL, R&D Systems) prior to CD16 triggering, and cytotoxicity in the form of CD107a degranulation/expression was evaluated by flow cytometry. Data (means \pm SEM) are expressed as frequencies of CD107a-expressing cells in KIR/NKG2A(+) CD3(-) cell populations from HD and CML-CP patients. Full cohort data are shown. Statistical significance determined by the Mann-Whitney non-parametric test. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 3. IFN- γ expression by KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells from HD and CML-CP patients in response to TCR engagement. PBMCs were cultured for 16 hours with anti-CD3/CD28 beads (Dynabeads® Human T-activator CD3/CD28, Invitrogen). PBMCs were then membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed and permeabilized, and then stained with anti-Eomes-AF64 and anti-IFN- γ -FITC. IFN- γ expression was analyzed after gating on KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) CD3(+) cells. Histograms represent frequency (mean \pm SEM) of IFN- γ -expressing cells after TCR stimulation in HD and CML-CP patients. Full cohort data are shown.

PARTIE II - MANUSCRIT 2 : SUSTAINED TREATMENT-FREE REMISSION IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA IS ASSOCIATED WITH AN INCREASED FREQUENCY OF INNATE TCD8 T-CELLS

Emilie Cayssials, Florence Jacomet, Nathalie Piccirilli, Lucie Lefèvre, Lydia Roy, François Guilhot, Jean-Claude Chomel, Xavier Leleu, Jean-Marc Gombert, André Herbelin and Alice Barbarin

British Journal of Hematology, Janvier 2019

Dans le contexte du traitement par ITK, il est difficile d'apprécier spécifiquement le rôle joué par les effecteurs du SI dans le contrôle de la maladie. Les cas de rémissions prolongées après arrêt du traitement offrent l'opportunité d'observer l'effet net du SI sur la maladie résiduelle. L'hypothèse d'une restauration d'un état d'immunosurveillance est soulevée pour expliquer l'absence de récurrence moléculaire après suspension du traitement antitumoral. Deux équipes ont observé une corrélation entre une proportion accrue de cellules NK matures et une probabilité supérieure de succès d'arrêt. En revanche, aucune corrélation n'a pu être établie avec les LT CD8 conventionnels.

La deuxième partie de notre travail (**Manuscrit 2**) a consisté à analyser le statut des LT CD8 innés (cellules T TCR- $\alpha\beta^+$ CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺) chez des patients en succès prolongé d'arrêt de leur ITK (≥ 2 ans) (TKI-DISC) comparativement à des patients en MMR sous ITK (TKI-IN) et au diagnostic de la maladie (LMC-PC). Nous avons émis l'hypothèse que les LT CD8 innés jouaient un rôle d'effecteur anti-leucémique au cours de la LMC et qu'ainsi leurs caractéristiques numériques et/ou fonctionnelles sont restaurées de manière optimale chez les patients TKI-DISC par rapport aux patients LMC-PC et TKI-IN.


De manière intéressante, nous avons observé une supra normalisation numérique des LT CD8 innés, avec une fréquence au sein des LT CD8 totaux augmentée d'un facteur trois chez

les patients TKI-DISC comparativement aux patients TKI-IN et aux témoins sains. La fréquence des LT CD8 totaux est en revanche comparable entre les trois groupes, suggérant une reprogrammation du SI en faveur de la différenciation des LT CD8 innés au sein du compartiment LT CD8. Sur le plan fonctionnel, l'expression de la perforine et de l'IFN- γ en réponse à la combinaison de cytokines pro-inflammatoires IL-12+IL-18 est restaurée de manière complète chez les patients TKI-DISC par rapport aux patients LMC-PC.

Les LT CD8 innés partagent avec les cellules NK, des propriétés fonctionnelles antitumorales et homéostasiques. De manière intéressante, nous avons mis en évidence chez les patients TKI-DISC une corrélation entre la fréquence des LT CD8 innés et celle des cellules NK dans le sang périphérique.

En conclusion, les LT CD8 innés pourraient participer en tant qu'effecteur au maintien en rémission après arrêt des ITK et constituer en association avec les cellules NK un biomarqueur prédictif du succès d'arrêt des ITK dans la LMC.

Sustained treatment-free remission in chronic myeloid leukaemia is associated with an increased frequency of innate CD8(+) T-cells

Emilie Cayssials,^{1,2,3,4,5}  Florence Jacomet,^{1,3,4,6} Nathalie Piccirilli,^{1,3,4} Lucie Lefevre,^{1,3} Lydia Roy,^{7,8} François Guilhaud,^{4,5} Jean-Claude Chomel,⁹ Xavier Leleu,^{2,3,4,5} Jean-Marc Gombert,^{1,3,4,5,6} André Herbelin^{1,3} and Alice Barbarin^{1,3}

¹INSERM 1082, ²Service d'Oncologie Hématologique de Thérapie Cellulaire, CHU de Poitiers, ³Université de Poitiers, ⁴CHU de Poitiers, ⁵INSERM CIC-1402, ⁶Service d'Immunologie et d'Inflammation, CHU de Poitiers, Poitiers, ⁷Service Clinique d'Hématologie, Hôpital Henri-Mondor, ⁸Université Paris-Est Créteil, Créteil, and ⁹Service de Cancérologie Biologique, CHU de Poitiers, Poitiers, France

Received 11 January 2019; accepted for publication 22 January 2019

Correspondence: André Herbelin, U1082 INSERM, Pôle Biologie Santé, 1, rue Georges Bonnet, 86000 Poitiers, France.
E-mail: andré.herbelin@inserm.fr

Emilie Cayssials and Florence Jacomet contributed equally to this work.

André Herbelin and Alice Barbarin contributed equally to this work as senior authors.

Tyrosine kinase inhibitors (TKI) have revolutionized the prognosis of chronic myeloid leukaemia (CML) (Druker *et al*, 2006). Notwithstanding their remarkable efficacy, they are not curative due to the insensitivity of quiescent leukaemic stem cells to TKI. Consequently, for the majority of patients, the persistence of residual leukaemic cells necessitates lifelong TKI therapy (Corbin *et al*, 2011). For more than a decade, treatment discontinuation protocols have been offered to patients with deep and stable molecular response. However, and without predictability, approximately 50% of them experience loss of major molecular remission (MMR) and must consequently reinitiate TKI treatment, with the majority of molecular recurrences occurring during the first 6 months (80%) (Saussele *et al*,

Summary

Immunological mechanisms of treatment-free remission (TFR) in chronic myeloid leukaemia (CML) are poorly defined and, to date, no correlation between successful TFR and CD8(+) T-cell subsets has been found. We analysed a new identified human subset of CD8(+) T-cells, namely innate CD8(+) T-cells, in CML patients with TFR ≥ 2 years. We demonstrated a dramatic increase of functionally active innate CD8(+) T-cells in these patients as compared to control subjects and patients in remission under tyrosine kinase inhibitors. Moreover, we found a positive correlation between frequencies of innate CD8(+) T-cells and natural killer cells, possibly representing a new innate biomarker profile of successful TFR.

Keywords: chronic myeloid leukaemia, tyrosine kinase inhibitors, successful treatment discontinuation, innate CD8(+) T-cells, NK cells.

2018). At the same time, the other 50% maintain treatment-free remission (TFR) despite the persistence of leukaemic cells, thereby suggesting control by the immune system of this residual clone. For this reason, immune mechanisms underlying TFR deserve consideration as a means of identifying promising targets for immunotherapeutic strategies and allowing more patients to stop TKI therapy. A number of recent papers report on immune markers that could be associated with successful TKI cessation: high natural killer (NK) cell and low CD86(+) plasmacytoid dendritic cells, $\gamma\delta$ (+) T-cell and CD4(+) CD25(+) CD127^{low} regulatory T-cell counts before discontinuation correlated significantly with successful therapy discontinuation (Imagawa *et al*, 2015; Ilander *et al*, 2016; Rea

et al, 2017; Schütz *et al*, 2017). In contrast, no association has been found between successful TKI discontinuation and conventional CD8(+) T-cells, well-known for their anti-tumour activity (Ilander *et al*, 2016; Rea *et al*, 2017).

We recently identified a distinct new human CD8(+) T-cell subset exhibiting innate markers [pan-KIR/NKG2A(+)] with high expression of the transcription factor Eomesodermin (Eomes), endowed with perforin expression and cytotoxic activity, and which promptly produces interferon (IFN)- γ after exposure to pro-inflammatory cytokines (Jacomet *et al*, 2015). These features support the notion that this distinct pool of CD8(+) T-cells, designated here as "innate CD8(+) T-cells", plays a role in cancer immune surveillance analogous to NK cells. Like NK cells, innate CD8(+) T-cells were found to be severely reduced, both numerically and functionally, in patients diagnosed with chronic phase CML (CML-CP) (Chen *et al*, 2012; Jacomet *et al*, 2017). Knowing that these deficiencies have been at least partially repaired in patients having achieved MMR following TKI therapy, here we addressed the question of whether successful treatment discontinuation in CML is associated with increased proportions and/or functions of innate CD8(+) T-cells in peripheral blood.

Among our cohort of CML patients, 14 patients had maintained TFR for more than 2 years after TKI discontinuation (TKI-DISC patients). Nine TKI-DISC patients (60%) had been administered IFN- α before TKI therapy. We concurrently analysed other local cohorts of patients or healthy donors: (i) patients in MMR or in deep molecular response (MR4, MR4.5) undergoing imatinib or dasatinib treatment (TKI-IN patients, $n = 22$), (ii) CML-CP patients at the time of diagnosis prior to the introduction of any treatment ($n = 15$), and healthy donors (HD, $n = 21$) obtained from the French national blood bank (EFS, Lyon, France) (see Table S1 for group characteristics). Median duration of treatment of TKI-IN patients and TKI cessation of TKI-DISC patients was 12 months (range, 12–108) and 81 months (range, 36–134), respectively. Methods are available in the Data S1.

We reasoned that, if innate CD8(+) T-cells significantly contribute to successful treatment discontinuation in CML patients, we can anticipate a further increase in numbers and/or functions of this cell subset in long-term remission after treatment discontinuation. This was the case, as attested by a three-fold increase in innate CD8(+) T-cell frequency among total CD8(+) lymphocytes in TKI-DISC patients ($19.25\% \pm 8.24\%$; mean \pm standard deviation, SD), as compared to TKI-IN patients ($5.55\% \pm 3.74\%$; mean \pm SD) (Fig 1A). Together with the fact that frequencies of total CD8(+) T-cells did not differ between the two groups (Figure S1A), this finding strongly suggests a shift in the lymphocyte profile of CD8(+) T-cells in TKI-DISC patients in favour of innate CD8(+) T-cells. In agreement with this hypothesis, innate CD8(+) T-cell frequencies were higher in TKI-DISC patients than in HD ($6.02\% \pm 4.30\%$; mean \pm SD) (Fig 1A). Interestingly, a significantly higher proportion of conventional memory (Eomes(+)/pan-KIR/

NKG2A(+)) CD8(+) T-cells was evidenced in TKI-DISC patients at the expense of their naïve-like (Eomes(-)/KIR/NKG2A(-)) CD8(+) T-cell counterparts, a phenomenon that was not observed in HD (Fig 1C and Figure S1B). Taken together, our results highlight the role of Eomes(+) memory CD8(+) T cells in sustaining remission, particularly the distinct innate CD8(+) T-cell subset sharing functional properties with NK cells. This association between higher frequency of a T-cell subset and successful TKI discontinuation is new. We presume that the reason why previous immunological studies did not find any association regarding T-cells (Ilander *et al*, 2016; Rea *et al*, 2017) is explained by our distinct strategy analysis of CD8(+) T-cells, which includes expression of the transcription factor Eomes.

Importantly, the higher proportion of innate CD8(+) T-cells was accompanied by a dramatic improvement of functional potential in innate CD8(+) T-cells, as attested by perforin expression and IFN- γ production in response to interleukin (IL)-12 + IL-18 stimulation, both of which were completely reversed, as was the case in the TKI-IN cohort, compared to data found in CML-CP patients (Fig 1B).

At this stage, there is no definitive mechanistic explanation for the specific pronounced development/generation of innate CD8(+) T-cells in TKI-DISC patients. Differentiation of innate CD8(+) T-cells in mice (named "innate memory" or "virtual memory" according to whether differentiation occurs in the thymus or the spleen) depends on promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF)-expressing invariant NK T (iNKT) cells *via* their IL-4 production (Weinreich *et al*, 2010). However, notwithstanding our recent demonstration of a significant positive correlation between iNKT PLZF expression and innate CD8(+) T-cell Eomes expression with data pooled from HD, CML-CP and TKI-IN patients (Jacomet *et al*, 2017), a similar association was not found in the TKI-DISC cohort (Figure S2). On the other hand, as a manifestation of the off-target effects of TKI, some TKI treatments are associated with expansion of NK cells and/or cytotoxic T-cells (Christiansson *et al*, 2015), while IFN- α has been documented to drive *in vivo* expansion of the innate CD8(+) T-cell pool in mice (Martinet *et al*, 2015). Our data do not suggest an additional effect of IFN- α in the TKI-DISC cohort, given the same proportions of innate CD8(+) T-cells, regardless of previous exposure to IFN- α therapy (Figure S3). Finally, one cannot exclude determinism of the individual immune status of these patients. We found no link between the age of patients and innate CD8(+) T-cell frequencies in the TKI-DISC group (Figure S4A). Given that Quinn *et al* (2018) have recently found that aging causes accumulation of memory KIR(+)/CD45RA(+)/CD8(+) T-cells and that the median age of TKI-DISC patients is close to 70 years as opposed to 44 years in TKI-IN patients, we compared CD8(+) innate T-cell frequencies in the two groups of patients and HD matched on age. By applying this method, the significant increase of this T-cell pool of interest in the TKI-DISC group was maintained, thereby confirming that it

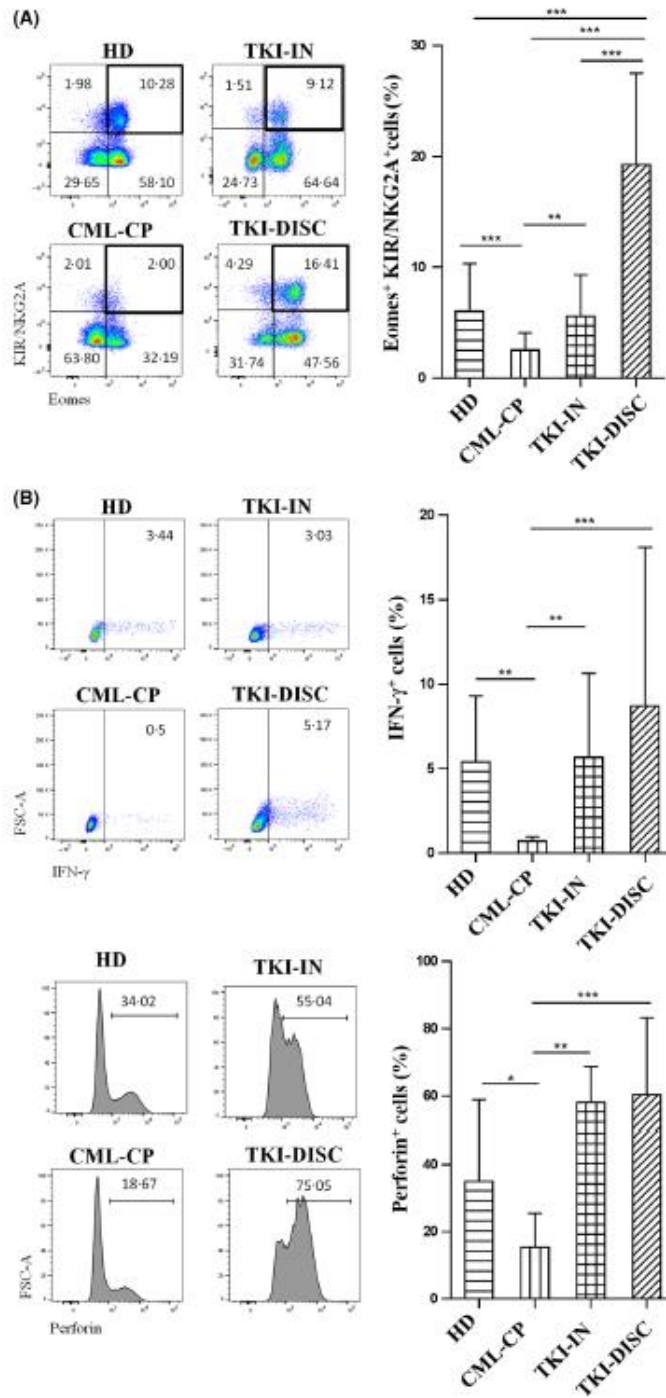


Fig 1. Successful TKI therapy cessation is associated with quantitative improvement of innate CD8(+) T-cells. (A) Representative dot plots showing the frequencies of innate CD8(+) T-cells, defined as Eomes(+)/KIR/NKG2A(+) cells after gating on total CD8(+)CD3(+) live lymphocytes (left panel). Histogram represents cohort analysis of innate CD8(+) T-cell frequencies (mean \pm SD) in HD ($n = 21$), CML-CP patients ($n = 14$), TKI-IN patients ($n = 22$) and TKI-DISC patients ($n = 14$) (right panel). Statistical analysis: Mann-Whitney test. (B) Interferon (IFN)- γ (upper panel) and perforin (lower panel) expression in innate CD8(+) T-cells. IFN- γ was analysed after 48 h of culture with IL-12 + IL-18 while perforin expression was assessed directly *ex vivo*. Representative dot plots and histograms of IFN- γ or perforin frequencies (mean \pm SD) for each group are shown. Statistical analysis: Mann-Whitney test. CML-CP, chronic myeloid leukaemia in chronic phase; HD, healthy donors; TKI-DISC, patients that had maintained treatment-free remission for more than 2 years after discontinuation of tyrosine kinase inhibitor; TKI-IN, patients currently undergoing treatment with a tyrosine kinase inhibitor.

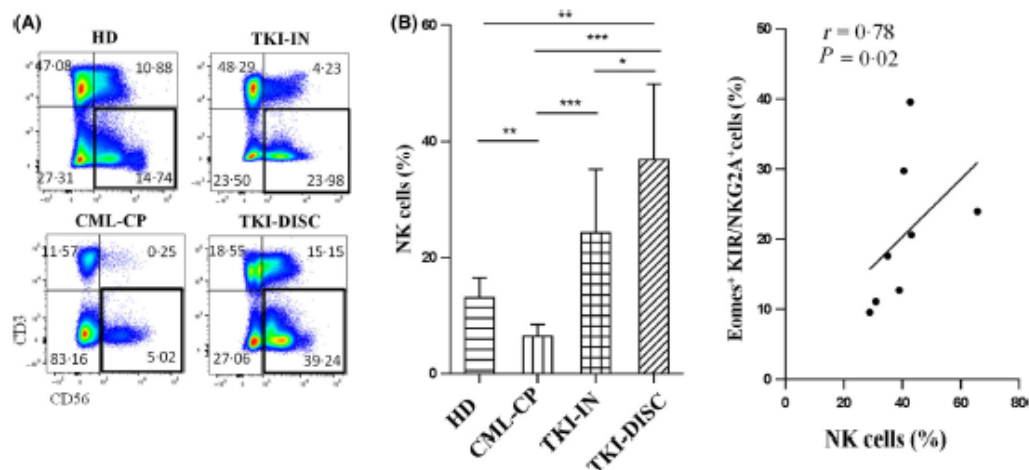


Fig 2. Successful TKI therapy cessation is associated with increased frequencies of NK cells, as for innate CD8(+) T-cells. (A) Frequency (mean \pm SD) of NK cells (CD3(+)CD56(+) cells) among total live lymphocytes in each group is shown. (B) Positive correlation between frequencies of innate CD8(+) T-cells and NK cells in TKI-DISC patients ($n = 10$). Spearman correlation test. $*P < 0.05$, $**P < 0.001$, $***P < 0.0001$. CML-CP, chronic myeloid leukaemia in chronic phase; HD, healthy donors; NK, natural killer; TKI-DISC, patients that had maintained treatment-free remission for more than 2 years after discontinuation of tyrosine kinase inhibitor; TKI-IN, patients currently undergoing treatment with a tyrosine kinase inhibitor.

cannot be explained by higher age in the TKI-DISC group alone (Figure S4B).

Innate CD8(+) T-cells share with NK cells signals that induce their generation and their functional properties (Jacomet *et al*, 2015; Abel *et al*, 2018). Consistent with this notion, as for innate CD8(+) T-cells, an increased proportion of NK cells among total peripheral blood lymphocytes ($36.83\% \pm 12.99\%$ vs. $13.04\% \pm 3.48\%$ in HD; mean \pm SD) (Fig 2A) was associated with successful TKI discontinuation, and we found an increased proportion of NK cells in TKI-DISC patients compared to HD, in agreement with previous reports (Ilander *et al*, 2016; Rea *et al* (2017). Moreover, we observed a significant positive correlation between the proportion of NK cells and innate CD8(+) T-cells in TKI-DISC patients, suggesting a possible mechanistic link of development of these lymphocyte populations associated with successful TKI discontinuation (Fig 2B).

Taken together, our findings help to demonstrate that immunological variables of the innate immune system,

namely innate CD8(+) T-cells, together with NK cells, are linked to clinical outcome in TFR upon TKI discontinuation and strengthen the rationale for a prospective study aimed at further demonstrating the existence of a direct relationship between the functional potential of innate CD8(+) T-cells and successful treatment discontinuation. If the latter is the case, the future use of innate CD8(+) T-cells and NK cells in combination as a predictor of successful TKI cessation could be envisioned.

Acknowledgements

The English of the manuscript was reviewed by Jeffrey Arsham, an American medical translator. We also wish to thank Image UP (Université de Poitiers) flow cytometry core facilities. This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer (Comités départementaux de la Vienne, de la Charente, de la Charente Maritime et des Deux-Sèvres), Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes (ARIM-PC), and le Cancéropôle Grand

Short Report

Sud-Ouest et le Groupement Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation Sud-Ouest Outre-Mer (API-K 2017), and INCa-DGOS 8658 (PRT-K 2015-052). A.B. and E.C. were supported by fellowships provided by Fondation Brystol-Meyers Squibb and Région Nouvelle Aquitaine, and Sport & Collection, respectively.

Author contributions

E.C. and F.J. designed and performed the experiments, analysed and interpreted the data, and wrote the manuscript. A.B. designed the experiments, assisted with flow cytometry analysis and interpreted the data. N.P. and L.L. performed the experiments and contributed to the preparation of peripheral mononuclear blood cells from patients and healthy controls. L.R., J.C.C., F.G. and X.L. provided clinical samples and contributed to data interpretation. A.H., J.M.G. and A.B. together were responsible for the overall study design, supervised the project and took primary responsibility for writing the manuscript.

References

- Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S. & Malarkannan, S. (2018) Natural killer cell development, maturation, and clinical utilization. *Frontiers in Immunology*, **9**, 1869.
- Chen, C.L.-U., Koschmieder, S., Kerstiens, L., Schemionek, M., Alwiler, B., Fischer, S., Gerss, J., Maeder, H.T., Berdel, W.E., Juergens, H., Lee, P.P. & Rossig, C. (2012) NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. *Leukemia*, **26**, 465–474.
- Christianson, L., Söderlund, S., Mangsbo, S., Hjorth-Hansen, H., Höglund, M., Markevich, B., Richter, J., Stenke, L., Mustjoki, S., Loskog A. & Olsson-Strömberg, U. (2015) The tyrosine kinase inhibitors imatinib and dasatinib reduce myeloid suppressor cells and release effector lymphocyte responses. *Molecular Cancer Therapeutics*, **14**, 1181–1191.
- Corbin, A.S., Agarwal, A., Lonkar, M., Cortez, J., Deininger, M.W. & Druker, B.J. (2011) Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *The Journal of Clinical Investigation*, **121**, 396–409.
- Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W.N., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B.L., Gabrilove, J.L., Rousset, P., Reiffers, J., Cornelissen, J.J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J.L., Radich, J.P., Simonsson, B., Taylor, K., Bacarani, M., So, C., Levak, L., Larson, R.A.; for the IRIS Investigators (2006) Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, **355**, 2408–2417.
- lander, M., Olsson-Strömberg, U., Schlums, H., Guilhot, J., Brück, O., Lähdenmäki, H., Kasanen, T., Koskenvesa, P., Söderlund, S., Höglund, M., Markevich, B., Sjölander, A., Lotfi, K., Dreimane, A., Lübking, A., Holm, E., Björman, M., Lehmann, S., Stenke, L., Ohm, L., Gedde-Dahl, T., Majeed, W., Ehrencrona, H., Koskela, S., Saussède, S., Mahon, F.X., Porikka, K., Hjorth-Hansen, H., Bryceson, Y.T., Richter, J. & Mustjoki, S. (2016) Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **31**, 1108–1116.
- Imagawa, J., Tanaka, H., Okada, M., Nakamae, H., Hino, M., Murai, K., Ishida, Y., Kumagai, T., Sato, S., Ohashi, K., Sakamaki, H., Wakita, H., Uoshima, N., Nakagawa, Y., Minami, Y., Ogasawara, M., Takeoka, T., Akasaka, H., Utsumi, T., Uike, N., Sato, T., Ando, S., Usuki, K., Morita, S., Sakamoto, J. & Kimura, S.; for the DADI Trial Group (2015) Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. *The Lancet. Haematology*, **2**, e528–535.
- Jacomot, F., Cayssiels, E., Barbous, S., Levescot, A., Piccirilli, N., Desmier, D., Robin, A., Barra, A., Giraud, C., Guilhot, F., Roy, L., Herbelin, A. & Gombert, J.-M. (2015) Evidence for cohesin-expressing innate-like CD8(+) KIR/2G2A(+) T-cells in human adults and cord blood samples. *European Journal of Immunology*, **45**, 1926–1933.
- Jacomot, F., Cayssiels, E., Barbarin, A., Desmier, D., Barbous, S., Lefevre, L., Levescot, A., Robin, A., Piccirilli, N., Giraud, C., Guilhot, F., Roy, L., Herbelin, A. & Gombert, J.-M. (2017) The hypothesis of the human INKT/innate CD8(+) T-cell axis applied to cancer: evidence for a deficiency in chronic myeloid leukemia. *Frontiers in Immunology*, **7**, 688.
- Martinet, V., Tonon, S., Torres, D., Azouz, A., Nguyen, M., Kohler, A., Flamand, V., Mao, C.-A., Klein, W.H., Leo, O. & Goriely, S. (2015) Type 1 interferons regulate cohesin expression and the development of unconventional memory CD8⁺ T-cells. *Nature Communications*, **6**, 7089.
- Quinn, K.M., Fox, A., Harland, K.L., Russ, B.E., Li, J., Nguyen, T.H.O., Loh, L., Oshanksky, M., Naeem, H., Tzaganov, K., Wiede, F., Webster, R., Byth, C., Song, X.Y.X., Tiganis, T., Powell, D., Doherty, P.C., Turner, S.J., Kodziarska, K. & Grata, N.L.L. (2018) Age-related decline in primary CD8⁺ T-cell responses is associated with the development of senescence in virtual memory CD8⁺ T-cells. *Cell Reports*, **23**, 3512–3524.
- Rea, D., Henry, G., Khamzad, Z., Etienne, G., Guilhot, F., Nicolini, F., Guilhot, J., Rousset, P., Huguier, F., Legros, L., Gardembas, M., Dubrulle, V., Guerci-Bresler, A., Charbonnier, A., Maloisel, F., Janotto, J.-C., Villemagne, B., Mahon, F.-X., Moins-Teisserenc, H., Dulphy, N. & Toubert, A. (2017) Natural killer-cell counts are associated with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. *Haematologica*, **102**, 1368–1377.
- Saussède, S., Richter, J., Guilhot, J., Gruber, F.X., Hjorth-Hansen, H., Almeida, A., Jansen, J.J.W.M., Mayer, J., Koskenvesa, P., Panayiotidis, P., Olsson-Strömberg, U., Martinez-Lopez, J., Rousset, P., Vestergaard, H., Ehrencrona, H., Kairito, V., Machová Poláková, K., Müller, M.C., Mustjoki, S., Berger, M.G., Fabarius, A.,

Compliance with ethical standards

The authors have no conflicting financial interests.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Data S1. Supplemental Material.

Figure S1. Frequencies of conventional CD8⁺ T-cells subsets in HD, CML-CP, TKI-IN and TKI-DISC patients.

Figure S2. Lack of correlation between the functional potential of innate CD8⁺ T-cells and iNKT cells in TKI-DISC patients (n=9).

Figure S3. High frequency of innate CD8⁺ T-cells in the TKI-DISC cohort is not associated with previous exposure to interferon-alpha.

Figure S4. The increase of the frequency of innate CD8⁺ T-cells in the TKI-DISC cohort is independent of age.

Table S1. Patient and healthy donor characteristics.

Short Report

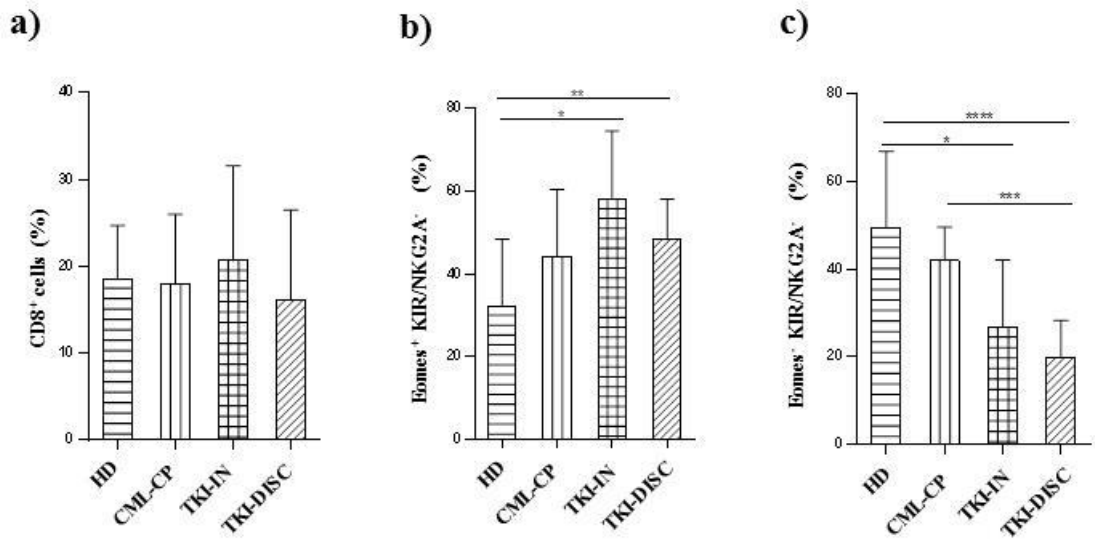
- Hofmann, W.K., Hochhaus, A., Pffirmann, M., Mahon, F.X.; for the EURO-SKI investigators. (2018) Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *The Lancet Oncology*, **19**, 747–757.
- Schütz, C., Inelmann, S., Saussle, S., Dietz, C.T., Müller, M.C., Eigendorff, E., Brendel, C.A., Metzelder, S.K., Brümmendorf, T.H., Waller, C., Dengler, J., Goebeler, M.E., Herbst, R., Freunck, G., Hannel, S., Illmer, T., Wang, Y., Lange, T., Finkernagel, F., Hehlmann, R., Huber, M., Neubauer, A., Hochhaus, A., Gullhot, J., Mahon, F.X., Pffirmann, M. & Burchert, A. (2017) Expression of the CTLA-4 ligand CD86 on plasmacytoid dendritic cells (pDC) predicts risk of disease recurrence after treatment discontinuation in CML. *Leukemia*, **31**, 829–836.
- Weinreich, M.A., Odumade, O.A., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. (2010) T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8⁺ T-cells. *Nature Immunology*, **11**, 709–716.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Venous blood from HD, and CML-CP, TKI-IN and TKI-DISC patients was collected on heparin. All patients gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki for participation in the study, which was approved by the scientific committee of the INSERM CIC-1402 (Poitiers, France). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood samples by density gradient centrifugation (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich), resuspended in RPMI medium supplemented with 90% fetal calf serum (FCS) and 10% DMSO, and cryopreserved at -80°C or in liquid azote until use.

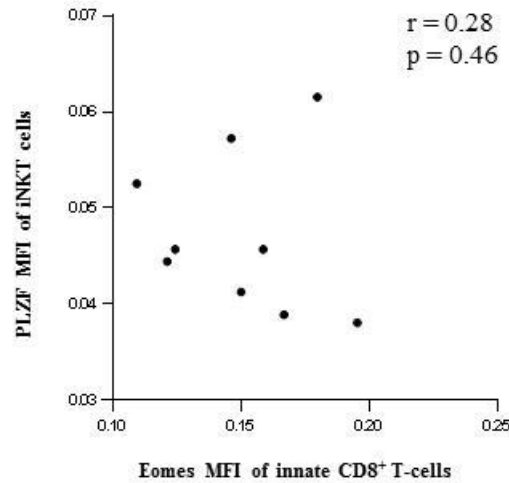
Phenotypic analysis of PBMC was performed by flow cytometry either *ex vivo* or after culture. For IFN- γ assay, cells were seeded into 24-well plates (1×10^6 cells/mL) in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS and antibiotics. Cells were stimulated 48 hours with recombinant human IL-12 and IL-18 (20 ng/ml each, IL-12: R&D Systems; IL-18: MBL International) and Golgistop (BD Biosciences) was added in the last 4 hours of culture. Expression of different markers was assessed by staining with appropriate combinations of monoclonal antibodies conjugated directly to fluorochromes and directed against anti-TCR- $\alpha\beta$ BV421 (clone: IP26, BioLegend), anti-CD8 PE-Cy7 (clone: RPA-T8, Biolegend), anti-TCR V α 24-J α 18 APC (clone: 6B11, BioLegend), anti-IFN- γ FITC (clone: B27, BioLegend), anti-CD3 BV421 (clone: UCHT1, BD-Biosciences), anti-CD56 BV510 (clone: HCD56, BioLegend), anti-perforin FITC (clone: δ G9, BD-Biosciences), anti-PLZF PE (clone: Mags.21F7, eBiosciences) and anti-Eomes PerCP-eFluor® 710 (clone: WD1928, eBiosciences). KIR/NKG2A referred to staining with the mix of the three following antibodies from Miltenyi Biotech: anti-KIR2D PE (clone: NKVFS1), anti-KIR3DL1/KIR3DL2 (CD158e/k) PE (clone: 5.133) and anti-NKG2A (CD159a) PE (clone: REA110). For nuclear Eomes or PLZF staining and intracytoplasmic IFN- γ staining, cells were permeabilized with an anti-human Foxp3 staining kit (eBioscience) and a Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences), respectively. Cells were acquired by eight-color flow cytometry (FACS Verse™ cytometer with the FACSuite™ software, BD Biosciences), and data were analyzed with FlowJo™ v10 (Treestar). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software).

SUPPLEMENTARY FIGURE S1. Frequencies of conventional CD8⁺ T-cells subsets in HD, CML-CP, TKI-IN and TKI-DISC patients.



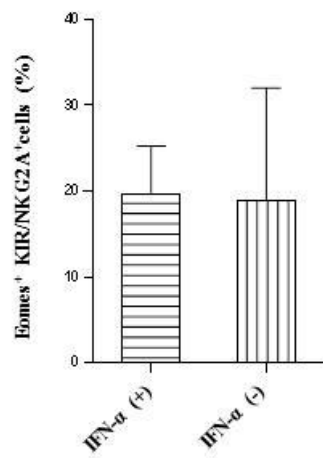
Frequencies (mean \pm SD) of total CD8⁺ T-cells among live lymphocytes (a), Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ among CD8⁺ T-cells (b) and Eomes⁻ KIR/NKG2A⁻ cells among CD8⁺ T-cells (c) in HD (n=21), CML-CP (n=15), TKI-IN (n=22) and TKI-DISC (n=14) patients. Note that in our experimental setup, Eomes⁺ KIR/NKG2A⁻ cells and Eomes⁻ KIR/NKG2A⁻ cells designated “conventional memory” and “naïve-like” pools of CD8⁺ T cells, respectively. Statistical analysis: Mann-Whitney test; *p<0.05, **p<0.001, ****p<0.0001.

SUPPLEMENTARY FIGURE S2. Lack of correlation between the functional potential of innate CD8⁺ T-cells and iNKT cells in TKI-DISC patients (n=9).



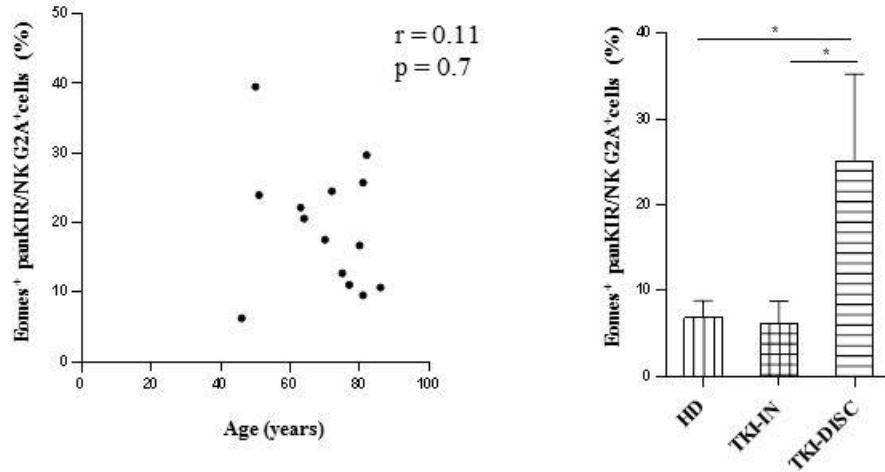
Eomes and PLZF expression were analyzed in innate CD8⁺ T-cells and iNKT cells (defined as CD3⁺ TCR V α 24-J α 18⁺ cells), respectively, by *ex vivo* flow cytometry after cellular permeabilization. MFI values are expressed relative to that of isotype control. No correlation between the levels of Eomes in KIR/NKG2A⁺ CD8⁺ T-cells and of PLZF in CD3⁺ TCR V α 24-J α 18⁺ cells was found in the TKI-DISC cohort (n=9). Correlation Spearman test.

SUPPLEMENTARY FIGURE S3. High frequency of innate CD8⁺ T-cells in the TKI-DISC cohort is not associated with previous exposure to interferon-alpha.



Histogram frequency (mean \pm SD) of innate CD8⁺ T-cells in TKI-DISC patients treated by interferon-alpha (IFN- α) before TKI therapy (IFN- α (+)) (n=9) *versus* in patients treated only by TKI (n=5) (IFN- α (-)). Statistical analysis: Mann-Whitney test (p=0.57).

SUPPLEMENTARY FIGURE S4. The increase of the frequency of innate CD8⁺ T-cells in the TKI-DISC cohort is independent of age.



a) Lack of correlation between frequency of innate CD8⁺ T-cells and age of patients in TKI-DISC cohort (n= 14). Correlation Spearman test. **b)** Histogram represents analysis of innate CD8⁺ T-cells frequencies (mean \pm SD) in HD (n=5), TKI-IN (n=5) and TKI-DISC (n=5) patients whose age is between 40 and 65 years. Statistical analysis: Mann-Whitney test. * $p < 0.05$.

Table SI. Patient and healthy donor characteristics.

N°	Sex	Age	Treatment	TT	MR	TFT	Cohort	N°	Sex	Age	Cohort
1	M	62	Ima	84	4.5	NA	TKI-IN	37	F	70	CML-CP
2	F	44	Ima	18	4.5	NA	TKI-IN	38	M	57	CML-CP
3	M	61	Ima	83	4.5	NA	TKI-IN	39	M	60	CML-CP
4	M	32	Ima	108	4.5	NA	TKI-IN	40	M	27	CML-CP
5	M	68	Ima	62	5	NA	TKI-IN	41	M	50	CML-CP
6	M	54	Ima	97	4.5	NA	TKI-IN	42	M	60	CML-CP
7	F	29	Ima	62	4.5	NA	TKI-IN	43	F	43	CML-CP
8	F	56	Dasa	12	4.5	NA	TKI-IN	44	M	58	CML-CP
9	M	48	Dasa	12	4.5	NA	TKI-IN	45	M	52	CML-CP
10	M	22	Dasa	12	4.5	NA	TKI-IN	46	F	58	CML-CP
12	M	53	Dasa	12	3	NA	TKI-IN	47	F	71	CML-CP
13	M	38	Dasa	12	4.5	NA	TKI-IN	48	F	57	CML-CP
14	F	39	Dasa	12	4	NA	TKI-IN	49	M	42	CML-CP
15	F	47	Dasa	12	3	NA	TKI-IN	50	F	59	CML-CP
16	M	48	Dasa	12	3	NA	TKI-IN	51	F	58	CML-CP
17	M	56	Dasa	12	3	NA	TKI-IN	52	F	27	HD
18	M	65	Dasa	12	3	NA	TKI-IN	53	M	58	HD
19	M	20	Dasa	12	4.5	NA	TKI-IN	54	F	40	HD
20	M	63	Dasa	12	3	NA	TKI-IN	55	M	41	HD
21	F	62	Dasa	12	3	NA	TKI-IN	56	M	24	HD
22	M	44	Ima	12	4.5	NA	TKI-IN	57	M	27	HD
23	F	57	Ima-Dasa	132.1	5	36	TKI-DISC	58	F	33	HD
24	F	51	IFN α -Ima-Dasa	168.2	5	63	TKI-DISC	59	M	25	HD
25	M	81	IFN α -Ima	192.4	5	115	TKI-DISC	60	F	56	HD
26	M	80	IFN α -Ima	252.2	5	112	TKI-DISC	61	F	30	HD
27	M	46	Ima	204.5	5	99	TKI-DISC	62	F	45	HD
28	F	81	Ima	144.5	4.5	66	TKI-DISC	63	M	65	HD
29	M	70	IFN α -Ima-Dasa-Nilo	264.1	4	48	TKI-DISC	64	M	26	HD
30	M	75	IFN α -Ima-Dasa	252	4.5	96	TKI-DISC	65	F	30	HD
31	F	64	IFN α -Ima-Dasa	264.1	4.5	48	TKI-DISC	66	F	51	HD
32	F	72	IFN α -Ima	252.3	4.5	134	TKI-DISC	67	M	57	HD
33	F	63	IFN α -Ima	156.2	5	112	TKI-DISC	68	F	37	HD
34	F	77	IFN α -Ima	228.6	4.5	117	TKI-DISC	69	M	26	HD
35	M	82	Ima-Nilo	240.2	4.5	39	TKI-DISC	70	M	41	HD
36	M	50	Ima-Dasa-Nilo	180.1	4.5	42	TKI-DISC	71	M	57	HD
								72	F	52	HD

TT: treatment time (months) (time of collection for TKI-IN cohort) ; MR molecular response (log); TFT: Treatment free time (months) (time of collection for TKI-DISC cohort); NA: not applicable; Ima: Imatinib; Dasa: Dasatinib; Nilo: Nilotinib; TKI-IN: under Imatinib or Dasatinib treatment; TKI-DISC: free-remission after TKI discontinuation for more than two years; CML-CP: chronic phase of CML; HD: healthy donor.

PARTIE III - MANUSCRIT 3 : PHENOTYPE OF NK-LIKE CD8(+) T CELLS WITH INNATE FEATURES IN HUMANS AND THEIR RELEVANCE IN CANCER DISEASES

Alice Barbarin, Emilie Cayssials, Florence Jacomet, Nicolas Gonzalo Nunez, Sara Basbous, Lucie Lefèvre, Myriam Abdallah, Nathalie Piccirilli, Benjamin Morin, Vincent Lavoue, Véronique Catros, Eliane Piaggio, André Herbelin, and Jean-Marc Gombert.

Frontiers in Immunology, 2017

Nous avons poursuivi la caractérisation des LT CD8 innés (cellules T TCR- $\alpha\beta^+$ CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺) chez l'Homme, à la fois en contexte physiologique et au cours de processus cancéreux (**Manuscrit 3**).

Nous avons analysé en cytométrie en flux si les LT CD8 innés exprimaient : **i**) d'autres marqueurs de cellules NK (CD56, CD161), **ii**) le marqueur CD49d (une $\alpha 4$ -intégrine) à l'instar de ce qui a été décrit concernant les LT CD8 « *innate-memory* » chez la souris. Nos résultats montrent que CD49d constitue un marqueur fonctionnel des LT CD8 innés. En effet, nous avons observé que contrairement à CD56 (marqueur associé aux cellules NK) ou CD161 (marqueur exprimé par les cellules NK et les LT innés tels que les iNKT, les MAIT, et les LT- $\gamma\delta$), CD49d est fortement exprimé par les LT CD8 innés comparativement au compartiment LT CD8 pris dans son ensemble et, que la majorité (>70%) des cellules qui répondent à une stimulation de type innée, telle que IL-12+IL-18, présente une forte expression de CD49d (cellules CD49d^{bright}). Néanmoins, CD49d ne peut être utilisé pour délimiter le contingent LT CD8 « *innate memory* » en périphérie chez l'Homme à la place de l'expression d'Eomes et de KIR/NKG2A car le contingent LT CD8 inné représente seulement 20 à 40% des cellules CD49d⁺.

Chez la Souris, la différenciation des LT CD8 « *innate memory* » dépend de facteurs solubles tels que l'IL-4, l'IL-15 et les interférons de type I. Chez le sujet sain, nous avons

montré en 2015, dans le sang de cordon placentaire, une corrélation entre la fréquence des LT CD8 innés et celle des LT PLZF⁺ (Jacomet et al, Eur J Immunol 2015). Par la suite, nous avons mis en évidence une corrélation entre la fréquence des iNKT et celle des LT CD8 innés, dans le sang périphérique, à partir d'échantillons de sujets sains et de patients LMC-PC (**Manuscrit 2**). Nous avons, de plus, observé dans un modèle de culture cellulaire *in vitro* une augmentation significative en valeur absolue des LT CD8 innés sous l'effet de l'IL-4, laquelle n'a revanche aucun d'impact sur le compartiment LT CD8 global (**Manuscrit 2**). L'ensemble de ces données suggèrent une implication possible, chez l'Homme, des iNKT dans la différenciation des LT CD8 innés *via* leur sécrétion d'IL-4. Concernant le défaut fonctionnel des iNKT au diagnostic de LMC-PC, nous avons dans un précédent travail (Basbous et al, J Pathol ; **Annexe 3**) pu rejeter l'hypothèse d'une origine intrinsèque de ce défaut en lien avec la présence de la protéine BCR-ABL au sein des cellules iNKT : le niveau global de phosphorylation des cellules iNKT en PC est identique à celui observé chez les sujets sains et très nettement inférieur à celui des cellules CD34⁺ BCR-ABL⁺ du *bulk* leucémique en PC. Nous avons pu montrer que les DC des patients LMC-PC sont incapables de présenter efficacement l'antigène aux iNKT contrairement au DC de sujets sains et qu'il existe un défaut d'expression de CD1d par les DC de patients LMC-PC ne dépendant pas uniquement de l'activité TK dérégulée de BCR-ABL. De manière intéressante, l'utilisation d'un inhibiteur de la Rho/ROCK (pour *rho associated protein kinase*), voie liée aux petites protéines G de la voie Rho impliquées dans la polymérisation de l'actine et le remodelage du cytosquelette, permet de rétablir une expression normale de CD1d par les DC. Ce dernier résultat a confirmé notre hypothèse que l'expression de la protéine BCR-ABL au sein des DC augmente le recrutement des petites protéines G de la famille Rho au niveau de son domaine DH-PH et bloque l'expression de CD1d à l'origine d'un défaut de présentation antigénique aux iNKT. Ainsi, nous proposons dans le **Manuscrit 3**, concernant la LMC-PC au diagnostic, le mécanisme d'immunosubversion suivant : le défaut

d'expression de CD1d par les DC entraîne un défaut d'expression de PLZF et de l'IL-4 par les iNKT et par conséquent un défaut de différenciation des LT CD8 innés.

Enfin, pour mieux comprendre leur signification physiologique, nous avons étudié les LT CD8 innés dans d'autres contextes physiopathologiques qu'une hémopathie maligne, plus précisément les cancers du sein et de l'ovaire. Nous avons mis en évidence leur présence dans les ganglions métastatiques de cancers du sein, ainsi que dans le stroma tumoral de cancers ovariens et ses localisations métastatiques péritonéales (liquide d'ascite et nodules de carcinose).



Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells with Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases

Alice Barbarin^{1,2†}, Emilie Cayssials^{1,2,3,4†}, Florence Jacomet^{1,2,4,5}, Nicolas Gonzalo Nunez^{6,7,8}, Sara Basbous^{1,4}, Lucie Lefèvre¹, Myriam Abdallah^{1,2}, Nathalie Piccirilli^{1,2}, Benjamin Morin¹, Vincent Lavoue^{9,10}, Véronique Catros^{10,11,12}, Eliane Piaggio^{6,7,8}, André Herbelin^{1,2,4†*} and Jean-Marc Gombert^{1,2,4,5†*}

¹INSERM 1082, Poitiers, France, ²CHU de Poitiers, Poitiers, France, ³Service d'Hématologie et d'Oncologie Biologique, CHU de Poitiers, Poitiers, France, ⁴Université de Poitiers, Poitiers, France, ⁵Service d'Immunologie et Inflammation, CHU de Poitiers, Poitiers, France, ⁶Institut Curie, PSL Research University, INSERM U832, Paris, France, ⁷SIRIC Translational Immunotherapy Team, Translational Research Department, Research Center, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France, ⁸Centre d'Investigation Clinique Biothérapie CICBT 1428, Institut Curie, Paris, France, ⁹INSERM U1242, Rennes, France, ¹⁰CHU de Rennes, Rennes, France, ¹¹INSERM U891, Rennes, France, ¹²CRB Santé de Rennes, Rennes, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Fernando A. Arosa,
Universidade da Beira Interior,
Portugal

Reviewed by:
Avery August,
Cornell University, USA
Wilhelm Gerner,
Veterinärmedizinische Universität,
Austria

***Correspondence:**
André Herbelin
andre.herbelin@inserm.fr;
Jean-Marc Gombert
jm.gombert@chu-poitiers.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work.

^{*}These authors have contributed
equally to this work as senior authors.

Specialty section:
This article was submitted to
T Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 15 December 2016

Accepted: 06 March 2017

Published: 27 March 2017

Citation:
Barbarin A, Cayssials E, Jacomet F,
Nunez NG, Basbous S, Lefèvre L,
Abdallah M, Piccirilli N, Morin B,
Lavoue V, Catros V, Piaggio E,
Herbelin A and Gombert J-M (2017)
Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells
with Innate Features in Humans and
Their Relevance in Cancer Diseases.
Front. Immunol. 8:316.
doi: 10.3389/fimmu.2017.00316

Unconventional T cells are defined by their capacity to respond to signals other than the well-known complex of peptides and major histocompatibility complex proteins. Among the burgeoning family of unconventional T cells, innate-like CD8(+) T cells in the mouse were discovered in the early 2000s. This subset of CD8(+) T cells bears a memory phenotype without having encountered a foreign antigen and can respond to innate-like IL-12 + IL-18 stimulation. Although the concept of innate memory CD8(+) T cells is now well established in mice, whether an equivalent memory NK-like T-cell population exists in humans remains under debate. We recently reported that CD8(+) T cells responding to innate-like IL-12 + IL-18 stimulation and co-expressing the transcription factor Eomesodermin (Eomes) and KIR/NKG2A membrane receptors with a memory/EMRA phenotype may represent a new, functionally distinct innate T cell subset in humans. In this review, after a summary on the known innate CD8(+) T-cell features in the mouse, we propose Eomes together with KIR/NKG2A and CD49d as a signature to standardize the identification of this innate CD8(+) T-cell subset in humans. Next, we discuss IL-4 and IL-15 involvement in the generation of innate CD8(+) T cells and particularly its possible dependency on the promyelocytic leukemia zinc-finger factor expressing iNKT cells, an innate T cell subset well documented for its susceptibility to tumor immune subversion. After that, focusing on cancer diseases, we provide new insights into the potential role of these innate CD8(+) T cells in a physiopathological context in humans. Based on empirical data obtained in cases of chronic myeloid leukemia, a myeloproliferative syndrome controlled by the immune system, and in solid tumors, we observe both the possible contribution of innate CD8(+) T cells to cancer disease control and their susceptibility to tumor immune subversion. Finally, we note that during tumor progression, innate CD8(+) T lymphocytes could be controlled by immune checkpoints. This study significantly contributes to understanding of the role of NK-like CD8(+) T cells and raises the question of the possible involvement of an iNKT/innate CD8(+) T cell axis in cancer.

Keywords: innate memory CD8(+) T cells, NK-like T cells, iNKT cells, natural killer receptors, Eomesodermin, CD49d, chronic myeloid leukemia, solid cancers

INTRODUCTION

The traditional view of the immune system distinguishes innate immunity from adaptive or acquired immunity. Innate immunity is derived from cells expressing the receptors specific for molecules from microbial pathogens called pathogen-associated molecular patterns or self-molecules from the healthy or unhealthy individual called damage-associated molecular patterns. One of the key characteristics of innate immunity effector mechanisms is their capacity for very rapid response to pro-inflammatory cytokines such as IL-12, IL-18, and IL-33.

The effectors of adaptive immunity possess receptors characterized by highly diverse and specific antigens. A major feature of adaptive immunity consists in its serving as an essential support for the immunologic memory, which means that it can remember and quite effectively respond to an antigen long after having encountered it for the first time.

However, numerous works over the past 20 years have shown the distinction between innate immunity and adaptive immunity to be less clear-cut and more tenuous than it first appeared. This revised perception is based, in particular, on description of non-conventional T cells responding to stimuli that had previously been considered as being recognized solely by innate cells. These populations of T lymphocytes include not only certain T-cell receptor (TCR)- $\gamma\delta$ cells but also TCR- $\alpha\beta$ cells such as natural killer T (iNKT) cells and innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells [for a list of the different cells, see Ref. (1, 2)].

A new contingent of innate T cells was described in the early 2000s in the mouse, partially in the thymus, where they were termed «innate memory» (IM) CD8(+) T cells, and partially in the spleen, where they were termed «virtual memory» (VM) CD8(+) T cells (3, 4). Aside from possessing a phenotype of activated memory cells, one characteristic of these cells consists in their differentiating into memory cells independently of a foreign antigen. In parallel, CD8(+) T cells in humans were described as cells possessing innate characteristics including NK markers. They were found in human cord blood, a finding consistent with the hypothesis that their development does not depend on foreign antigens. These cells hence were termed NK-like CD8(+) T cells.

At the outset of this review, we shall compare the human NK-like CD8(+) T cells with IM/VM CD8(+) T cells in mice. On the basis of this comparison and with regard to humans, we shall focus first on expression of the transcription factor Eomesodermin (Eomes) as a lineage marker of that population of cells, and then on their innate functions (cytotoxicity and TCR-independent IFN- γ expression), along with their memory phenotype, and on the roles of IL-4- and promyelocytic leukemia zinc-finger factor (PLZF)-expressing T cells in differentiation of these cells, hereafter referred to as innate CD8(+) T cells. We shall discuss the use of membrane markers, particularly the $\alpha 4$ -integrin CD49d, in order to obtain a more well-defined phenotype correlating with their functions and/or explaining their possible physiological role. Finally, we shall discuss the implication of innate CD8(+) T cells in anticancer immunity in humans.

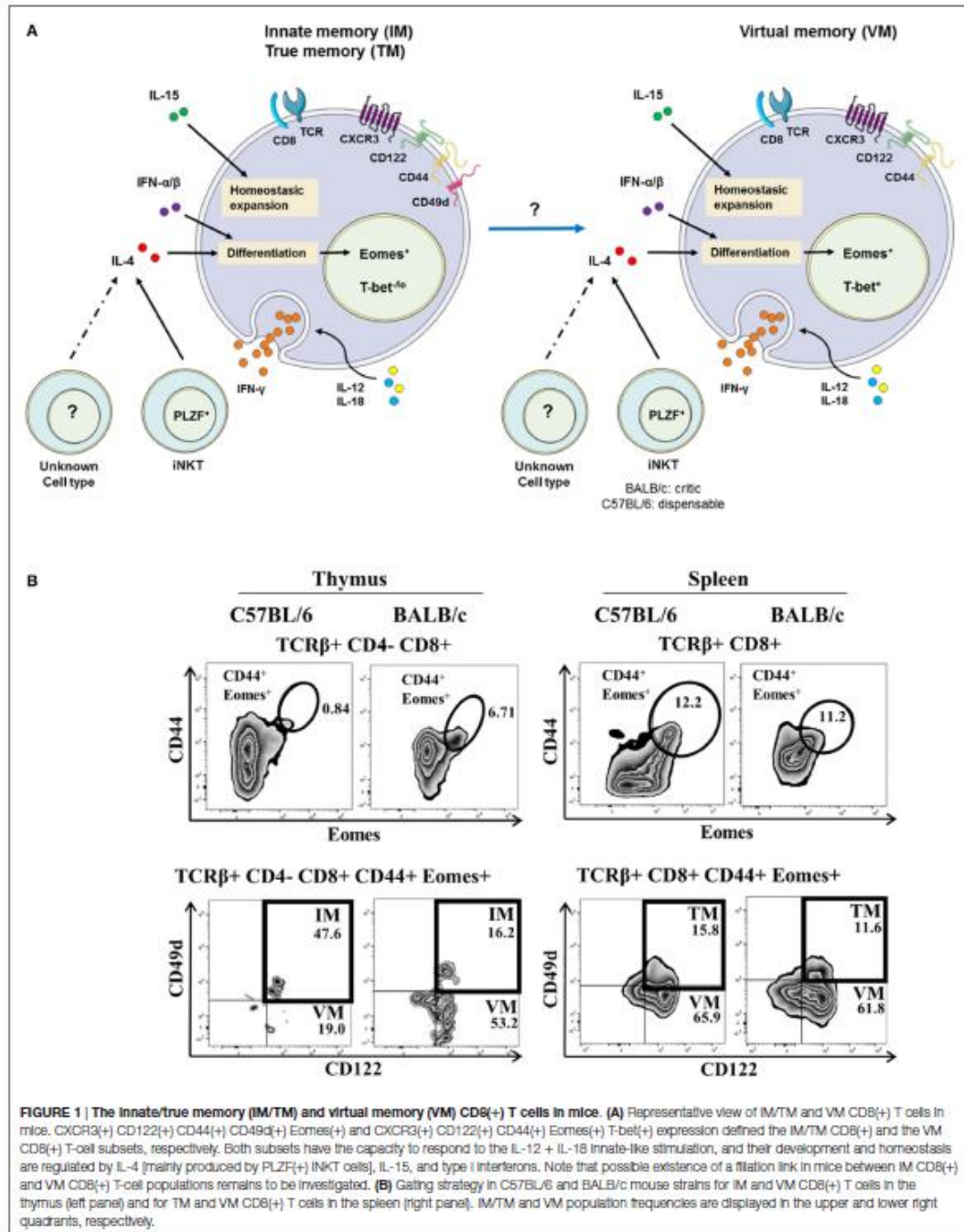
INNATE CD8(+) T LYMPHOCYTES IN MICE

Studies conducted shortly after 2000 by Forman et al. (5, 6) demonstrated the existence of CD8(+) T cells producing IFN- γ in response to innate signals occurring independently from the TCR. These CD8(+) T cells possessed a CD44(+) CD62L(-) CD122(+) memory phenotype and, *in vivo*, provided protection against *Listeria monocytogenes* (LM) infection (5–7). Their mobilization depended on the production of IL-12 and IL-18. Interestingly, the Forman team subsequently showed that this cell population was present in the thymus of C57BL/6 wild-type mice and that it was enriched in C57BL/6 H-2 K^b-D^b- mice not having undergone stimulation by foreign antigens (7).

A second series of studies having to do with Itk^{-/-} (inducing T cell kinase), Rlk^{-/-} (resting lymphocyte kinase), or Itk^{-/-}Rlk^{-/-} mice led to identification of a population of thymic CD8(+) T cells expressing an activated memory [CD44(+) CD62L(-) CD122(+)] phenotype and called IM CD8(+) T cells (8–12). Interestingly, these cells developed in the thymus and are exported to the spleen and the lymph nodes (LNs) where they could fulfill an anti-infective function against LM, particularly through production of IFN- γ following TCR-independent stimulation by IL-12 and IL-18. An important point in the studies dedicated to this population has been the demonstration that its differentiation depended on expression of the Eomes transcription factor and IL-15 (13–15). Eomes expression initiates the differentiation program of these cells and induces the expression of CD122 (the β chain of the IL-2 and IL-15 receptor). IL-15 has a critical role in the expansion of IM CD8(+) T cells (8, 16). It should also be noted that this population is present in Itk^{-/-}K^b-D^b- mice, a finding suggesting that at least some IM CD8(+) T cells are selected by non-classical major histocompatibility complex (MHC) class I molecules (9, 17–19).

A final series of studies has described in mouse spleens and peripheral lymphoid organs a population of activated [CD122(+)] and memory [CD44(+) CD62L(-)] CD8(+) T lymphocytes of which the differentiation into memory cells occurs independently of any recognition of a foreign antigen. This population consists in the so-called VM CD8(+) T cells. As is the case with IM T CD8(+) cells, Eomes and IL-15 are the two key factors in their differentiation. This population is capable of producing IFN- γ in response to innate stimulation by IL-12 + IL-18 (11, 20–22).

The expression by mouse thymic IM CD8(+) T cells of some integrins, such as CD49d [an $\alpha 4$ -integrin, or VLA- $\alpha 4$, which is most often matched with a $\beta 7$ -integrin (which is bound to Madcam and VCAM-1 or CD106), or a $\beta 1$ -integrin], has been described (14, 21, 23, 24). Hence, CD49d is used to discriminate between IM and VM T cells (Figure 1A) arising from the thymus or the spleen, respectively. In this model, a possible filiation link between IM CD8(+) and VM CD8(+) T-cell populations remains to be investigated. A gating strategy to identify IM/VM CD8(+) T cells in mice, taking Eomes, CD44, and CD122 together with CD49d as delineating markers is depicted in Figure 1B and Figure S1 in Supplementary Material.



Based on this gating strategy, in the C57BL/6 mouse strain, the vast majority of memory [CD44(+) Eomes(+) CD122(+)] CD8(+) T cells are IM CD8(+) T cells in the thymus vs. VM CD8(+) T cells in the spleen, as attested by their differential CD49d expression. Interestingly, in the BALB/c strain, thymic IM CD8(+) T cells are minority cells among memory CD44(+) CD122(+) Eomes(+) cells, raising the question of a possible link between IM and VM CD8(+) T cells, as well as the association of CD49d with the innate functions of IM/VM CD8(+) T cells (see CD49d, a Functional Marker of Innate CD8(+) T Cells in Humans).

IL-15 plays a key role in the homeostatic expansion of CD8(+) T cells, and it has been reported in several studies that this cytokine is implicated in differentiation into VM CD8(+) T cells after homeostatic proliferation (4, 25–28). However, August and his team have shown that the size of the IM/VM CD8(+) T population is not modified by T-cell depletion prior to bone marrow transplantation, a finding suggesting that lymphoid precursors are differentiated into IM/VM CD8(+) T cells following “tuning” by cells expressing MHC class I molecules. Moreover, in the same study, IM/VM CD8(+) T cells are distinguished from homeostatic proliferation CD8(+) T cells by a different transcriptional profile (29). Another study suggests that contrary to naive CD8(+) T cells and homeostatic proliferation CD8(+) T cells, acquisition of the phenotype of IM CD8(+) T cells necessitates engagement of their TCR (30).

EVIDENCE FOR NK-LIKE CD8(+) T CELLS IN HUMANS

In parallel with the previously described work on mice, several studies conducted in the early 2000s demonstrated the existence in humans of CD8(+) T cell-expressing markers and receptors of NK cells including CD56, KIR, NKG2A and NKG2C (CD159a and c), and CD94 (31–36). Several studies precisely characterized the phenotype of the KIR(+) CD8(+) T cells and showed that they possess an EMRA memory phenotype [CD45RA(+) CCR7(–) CD57(+)] (33, 34). Finally, Björkström et al. (33), showed that EMRA(+) KIR(+) CD8(+) T cells have a skewed repertoire using fewer different V β than their EMRA(+) KIR(–) CD8(+) T cell counterpart, a finding suggesting the role of antigenic pressure in the acquisition of this phenotype. An equivalent to this population of KIR/NKG2(+) CD8(+) T cells is present in human cord blood, where they possess an EMRA memory phenotype and rapidly express IFN- γ following TCR stimulation (36). In fact, this is a population of T cells that has been educated and has differentiated in the absence of foreign antigenic stimulation, into terminal effector memory T cells.

These KIR(+) CD8(+) T cells have a weaker response to TCR stimulation than their KIR(–) CD8(+) counterparts with regard to the expression of IFN- γ and TNF- α or to the degranulation evaluated by CD107a staining. The KIR(+) CD8(+) T cells expressing two different KIRs have a weaker response to TCR stimulation than cells expressing a single KIR or without KIR (33, 34). Remarkably, this CD56(+) [or KIR(+)] CD8(+) T cell subset responds quite effectively to innate stimuli, one example being

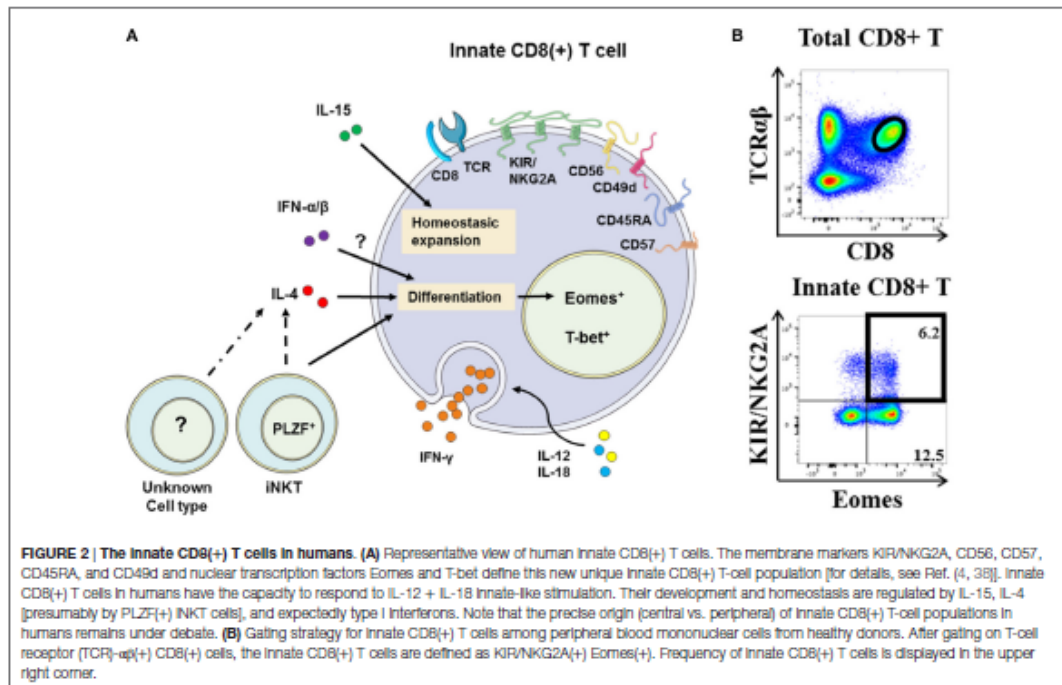
the association of IL-12 with IL-18 (37). The same team reported that loss of this function in *IL-12R^{-/-}* patients is associated with a risk of severe infections from intracellular germs, particularly mycobacteria and *Salmonella* (37).

HUMAN NK-LIKE CD8(+) T CELLS EXPRESS EOMES AND DISPLAY INNATE FUNCTIONS

The study by Jacomet et al. (38) showed that KIR(+) and/or NKG2A(+) CD8(+) T cells preferentially express Eomes. These KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells have a memory phenotype and share functional and phenotypic features (4, 38) with IM CD8(+) T cells in mice (8–11). Moreover, with respect to KIR/NKG2A(–) CD8(+) T cells, they possess an EMRA phenotype [CD45RA(+) CCR7(–)] and preferentially express the surface molecule CD57, which is a terminal differentiation marker (Figure 2A). Figure 2B shows a gating strategy designed to analyze these cells in human blood. Remarkably, the majority (around 60–70%) of KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells express the T-box transcription factor T-bet, a phenotype comparable to the phenotype described for mouse VM CD8(+) T cells (22). These cells are characterized by increased frequency of CD16(+) cells in comparison to conventional memory [KIR/NKG2A(–) Eomes(+)] CD8(+) T cells. Moreover, CD16 expression is substantially increased in KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells following 48 h of IL-15 *in vitro* treatment (Figure 3A).

Together with their marked NK-like phenotype, a hallmark of KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells is their capacity to rapidly produce large amounts of IFN- γ in response to innate-like stimulation by IL-12 + IL-18 (38). So it is that among the CD8(+) T cells, 60–70% of those possessing a capacity for innate response to IL-12 + IL-18 are KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells. Moreover, the frequency of the cells producing IFN- γ in response to IL-12 + IL-18 stimulation is four times greater than that of the same cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 agonistic monoclonal antibodies (mAbs) (38). In the same way, these cells possess a cytotoxic arsenal: perforin and granzyme B. They possess an innate cytotoxic potential induced by an anti-CD16 antibody and revealed by the CD107a test, which assesses degranulation (38). In the final analysis, these data demonstrate that KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells display innate activity by responding to innate stimuli with response efficacy greater than that of their response to adaptive stimuli (*i.e.*, via their TCR), as has also been shown for innate T-cell populations such as dendritic epidermal T cells (39).

A final element appearing to favor the innate character of KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cells is their differentiation without any exogenous antigenic stimulation, as it is possible to show the existence of these cells in the fetal thymus (40), and as our team has shown them to be present in cord blood. Interestingly, in cord blood, they express an EMRA phenotype with a lower CD57 cell frequency than in the adult, suggesting that there exist supplementary steps in the terminal maturation of these peripheral cells (38). Functionally, as is the



case in adult cells, these KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T cord blood cells express IFN- γ after innate-like stimulation by IL-12 + IL-18.

All in all, we described for the first time a CD8(+) T cells population with innate features by associating Eomes and KIR/NKG2A markers with the capacity to respond to IL-12 + IL-18 stimulation. These features validate the KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) T-cell compartment as a new member of the innate T cell family in humans, and we have termed them innate CD8(+) T cells (41).

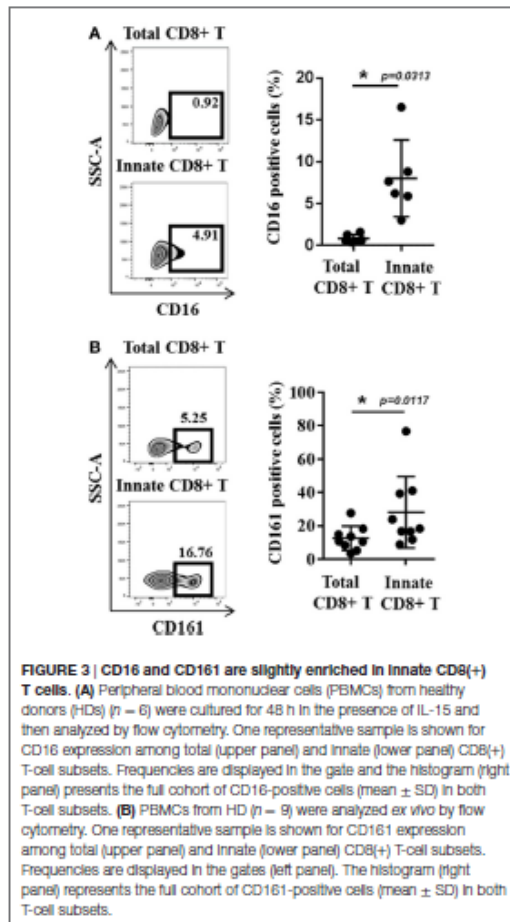
There exist a number of hypotheses on the mechanisms involved in the reprogramming of conventional T lymphocytes into innate CD8(+) T lymphocytes. One of these assumptions is based on a cross talk between IL-12R and TCR signalosome, in which IL-12 recruits Tyk2 and Fyn tyrosine kinases to activate CD3 ζ -TCR signal transduction pathways (42).

Some studies conducted in mice suggest that IM and/or VM CD8(+) T cells could be selected by non-classical MHC class I molecules (9, 17–19). In humans, our results (Figure S2 in Supplementary Material) show that a relatively small fraction of KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8(+) cells are MAIT cells. This finding suggests that at least some human innate CD8(+) T cells could be selected by non-classical class I MHC molecules, and it raises the possibility of the presence in this population of cells being restricted by non-classical MHC class I HLA-E molecules (18).

CD49d, A FUNCTIONAL MARKER OF INNATE CD8(+) T CELLS IN HUMANS

We have sought out other markers of innate CD8(+) T cells in humans. Among them, we tested CD56, a marker in humans associated with NK cells, but our results showed that this marker is no more effective in distinguishing the innate CD8(+) T-cell population than the KIR/NKG2A markers. More precisely, this marker delineate only 20–30% of the CD8(+) T cells expressing IFN- γ after innate stimulation by IL-12 + IL-18 (as opposed to the approximately 70% exhibited by the KIR/NKG2A markers) [data not shown; (38)]. We also tested CD161, of which the expression is a common feature of human innate T cell subsets including iNKT cells, TCR- $\gamma\delta$ T cells, and MAIT cells (43). However, as for CD56, CD161 is expressed by only approximately 20% of the Eomes(+) KIR/NKG2A(+) CD8(+) T cells (Figure 3B).

Reasoning by analogy with the mouse model, we tested CD49d expression by innate CD8(+) T cells in humans (Figures 4A,B). Interestingly, the CD8(+) T cells with the KIR/NKG2A(+) Eomes(+) phenotype strongly expressed CD49d, as compared to the CD8(+) T-cell population taken as a whole (Figure 4A). Moreover, the majority (almost 70%) of the cells with a more pronounced expression of CD49d consisted in those expressing IFN- γ after innate-like stimulation by IL-12 + IL-18 (Figure 4B). These results show CD49d to be closely associated



with the innate effector functions of the innate CD8(+) T cells. On the other hand, CD49d cannot substitute for Eomes and KIR/NKG2A, given the fact that only 20–40% of CD49d(+) cells are actually innate CD8(+) T cells (Figure S3 in Supplementary Material). However, as innate CD8(+) T cells arise from the thymus, the functional link between higher CD49d expression and IFN- γ secretion in response to IL-12 + IL-18 stimulation should be tested in cord blood, which is an accessible source of cells providing an approximate reflection of thymic cells in humans.

These results have led us to inquire about the biological meaning of CD49d expression by thymic vs. splenic (or IM vs. VM) CD8(+) T lymphocytes in mice. The results of several teams (14, 21) suggest that contrary to thymic IM CD8(+) cells, splenic (so-called VM) innate CD8(+) T cells do not express CD49d (14, 21) (Figure 1). We have observed, as in humans, that a large majority of splenic CD8(+) T cells expressing IFN- γ after

innate-like stimulation by IL-12 + IL-18 were those harboring the IM [Eomes(+) CD44(+) CD122(+)] phenotype (Figure 4C). Moreover, these IFN- γ -producing cells were mostly those that more pronouncedly expressed CD49d as compared to the total CD8(+) T-cell population (Figure 4D).

Taken as a whole, these different results suggest that CD49d is associated with the innate-like functions of NK-like CD8(+) T cells as much in humans as in mice. According to the β chain with which CD49d is matched, the cells are variably liable to migrate toward different territories. While the $\alpha 4\beta 7$ -integrin is associated with the migration of T lymphocytes toward the digestive mucosa, the $\alpha 4\beta 1$ -integrin is associated with migration toward the oral mucosa, the salivary glands, the vaginal mucosa, and the central nervous system (44, 45). Indeed, therapeutic targeting of CD49d is used in treatment of multiple sclerosis (MS). Several studies have documented the implication of CD49d in the penetration of pathogenic T lymphocytes during MS or experimental allergic encephalomyelitis (EAE) (46, 47). Taken together, these different observations raise the possibility of the implication of the innate CD8(+) T cells in the pathogenesis of MS/EAE.

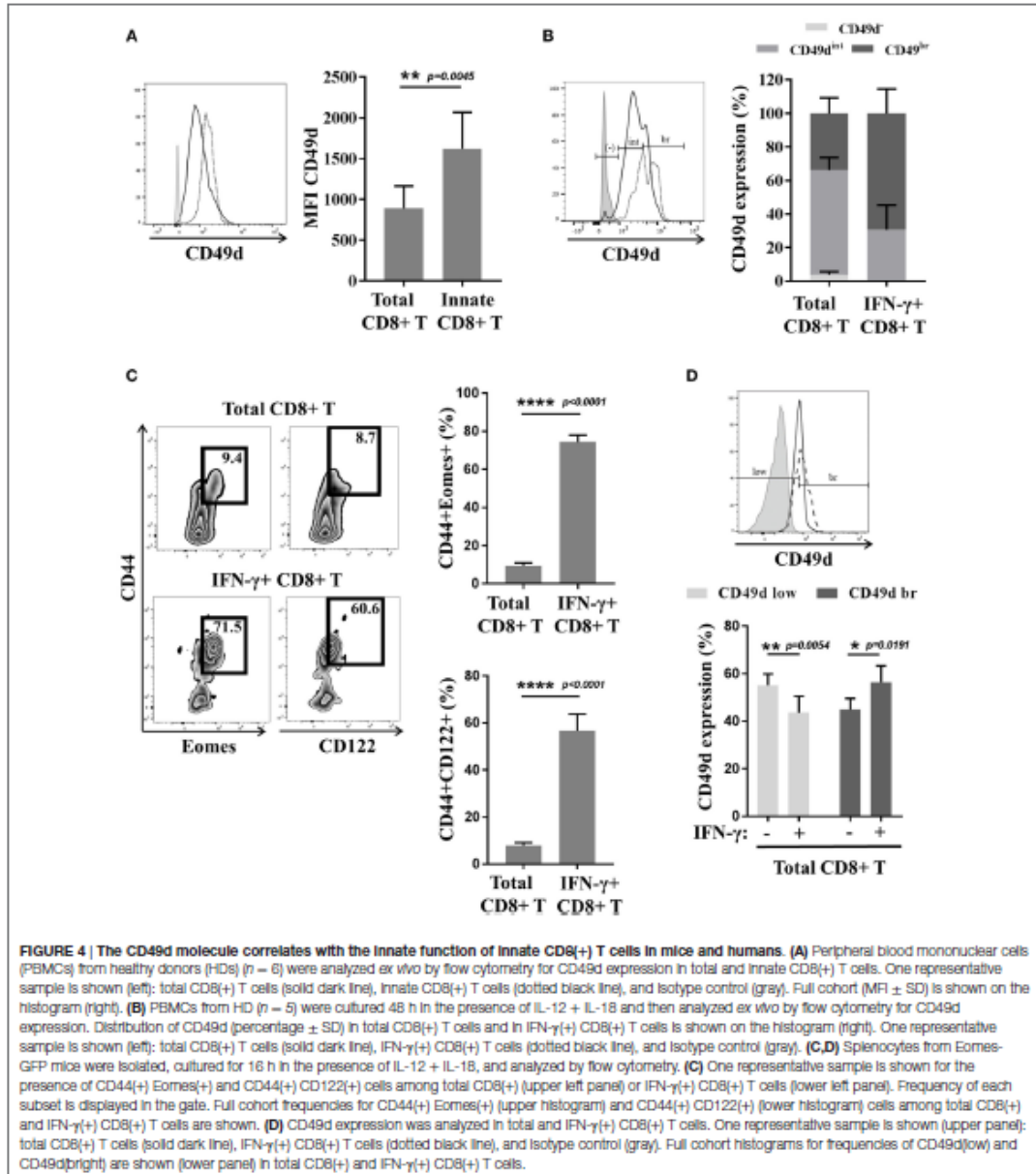
THE FACTORS ASSOCIATED/IMPLICATED IN CONTROL OF THE DIFFERENTIATION OF INNATE CD8(+) T LYMPHOCYTES

In mice, differentiation of IM CD8(+) T lymphocytes depends on soluble factors such as type I IFN and the IL-4 and IL-15 cytokines.

Several studies have shown that IL-4 favors the arising of VM CD8(+) T cells (48–51). More recent studies confirm the involvement of IL-4 in IM/VM CD8(+) T cell generation with a more critical role being assumed in the BALB/c (22, 30) than in the C57BL/6 mouse strain (14). IL-4-producing PLZF(+) T cells, including at least partially iNKT lymphocytes (52, 53), elicit the generation of IM CD8(+) T cells. Other results from the Hogquist group confirm the link between iNKT PLZF(+) cells, IL-4, and IM CD8(+) T cell generation by comparing different mouse strains (22). Figure 1B shows the higher frequency of T CD8(+) IM in the thymus of BALB/c in comparison with C57BL/6 mice. However, the August group shows results suggesting that IL-4 produced by differentiating CD4(+) CD8(+) double-positive thymocytes controls the generation of IM CD8(+) thymocytes in the *Itk*^{-/-} C57BL/6 background (16, 29). As concerns VM CD8(+) T lymphocytes, IL-4 is likewise at least partially implicated. IL-4 is likely to act by eliciting Eomes expression, of which the action would entail a heightened level of expression of CD122, and thereby sensitize the cells to IL-15 (14, 16).

Type I IFNs such as IFN- β and/or IFN- α (24) could favor the differentiation of lymphocytes to VM and/or IM CD8(+) T lymphocytes. The underlying mechanism described by the authors is the induction of Eomes expression by naive CD8(+) T cells.

Finally, IL-15 is a determining factor in the maintenance and/or homeostatic expansion of IM and VM CD8(+) T cells (8, 14, 16).



Few studies have addressed the role of these factors in the development of innate CD8(+) T cells in humans (38, 40). Interestingly, our own results (38) have shown a relation of proportionality between PLZF expression in T and iNKT lymphocytes and Eomes expression by innate CD8(+) T cells in cord blood, suggesting that iNKT cells control the

differentiation of human innate CD8(+) T cells. Our results *in vitro* (41) suggest that IL-4 favors Eomes expression and the generation and/or expansion of human innate CD8(+) T cells.

IS THERE A ROLE FOR INNATE CD8(+) T LYMPHOCYTES IN CANCER IMMUNOSURVEILLANCE?

There exist only sparse data in either humans or mice describing the functions of innate CD8(+) T lymphocytes. An initial set of results consisted in a demonstration in mice of a protective role of IM/VM CD8(+) T lymphocytes against viral (30, 54) and bacterial (11) infections. Our studies have been focused on the numeric/functional status of innate CD8(+) T lymphocytes during the multistep development of human tumors.

Innate CD8(+) T Lymphocytes in Chronic Myeloid Leukemia (CML)

Similarly to iNKT cells (55–58), innate CD8(+) T cells fulfill functions providing them with anticancer potential. Hence, a deficiency of these cells in CML (Box 1) on diagnosis is likely to constitute, as with iNKT cells (Box 2), an immune subversion signature. If this is indeed the case, parallel study of iNKT cells and innate CD8(+) T cells in CML both at diagnosis and following molecular remission by tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy could perhaps answer questions concerning a dynamic process of generation of innate CD8(+) T cells in humans that would depend on iNKT cells.

BOX 1 | Chronic myeloid leukemia (CML), a myeloproliferative syndrome controlled by the immune system.

Chronic myeloid leukemia is the first malignant disorder with a specific genetic abnormality in the background. It is due to the formation of the chimeric oncogene BCR-ABL. This oncogene is responsible for the transformation of hematopoietic stem cells (HSC) into leukemic stem cells, which results in a leukemic syndrome of mature myeloid cells characterizing the chronic phase (CP) and ineluctably evolving, without treatment, to acute leukemia (59). The ABL domain of the chimeric oncogene BCR-ABL presents deregulated tyrosine kinase activity, which is responsible for the transformation of the HSC. Since the outset of the 2000s, new CML treatment has consisted in the tyrosine kinase inhibitors of BCR-ABL. Some arguments suggest that CML is a disease in which the immune system has a key role [for review, see Ref. (60)]. In addition, during the chronic phase of CML, numerous innate anomalies in the innate immune system have been evidenced. Indeed, defective differentiation of the plasmacytoid dendritic cells, defective IFN- α production by mononuclear cells, and defective functions of NK cells have been observed (61, 62).

BOX 2 | Functional deficiency of iNKT cells in chronic phase of CML (CML-CP) patients.

Our team has shown in CML-CP patients at diagnosis a major defect in the iNKT lymphocyte functions, particularly as concerns their proliferative response to T-cell receptor (TCR) stimulation (63) and their cytotoxic arsenal, with a loss in the expression of perforin and FasL, two elements implicated in cancer immunosurveillance by iNKT cells in mice (57, 64). It must also be emphasized that the iNKT cells of CML-CP patients have lost their expression of the transcription factor promyelocytic leukemia zinc-finger factor and no longer produce IL-4 during TCR engagement; on the other hand, they show normal expression of IFN- γ in comparison with the iNKT lymphocytes of healthy donors or patients in complete remission following treatment by tyrosine kinase inhibitors such as imatinib mesylate (63).

There exists a major defect in the innate CD8(+) T cells of chronic phase of CML (CML-CP) patients compared to those of healthy subjects or patients in complete remission following TKI treatment (41). This numerical defect is associated with a loss of IFN- γ expression after innate-like stimulation by IL-12 + IL-18 cytokines and with a loss of degranulation after stimulation *via* CD16. On the contrary, IFN- γ expression after TCR stimulation (instead of IL-12 + IL-18 stimulation) by the same innate CD8(+) T cells during CP is conserved, thereby showing that the functional defect affecting our population of interest is innate rather than adaptive. Finally, there exists a partial reconstitution in CML remission patients of the frequency and functions of innate CD8(+) T lymphocytes in terms of IFN- γ expression in response to IL-12 + IL-18 and as regards the displaying of cytotoxic functions after CD16 stimulation.

In CML patients, the numerical and functional status of innate CD8(+) T cells seems closely linked to that of the iNKT cells. In analysis of a cohort of CP patients and those in complete remission, we have observed a correlation between Eomes expression by innate CD8(+) T cells and PLZF expression by iNKT cells (41). This finding underscores the possible pathophysiological significance of IL-4 expression by iNKT cells in CML patients; while deficient during the CP, IL-4 expression is restored in remission (63) and could determine the status of innate CD8(+) T cells during the disease or its treatment.

More generally, a scenario can now be outlined as a possible explanation, during CML, for immune subversion of innate CD8(+) T cells by leukemic cells. Immune subversion could result from dysfunction of the antigen-presenting cells (APCs), particularly leukemia myeloid dendritic cells (DCs) and their environment; they might be considered as responsible for the loss of function of the innate immune cells, including NK and innate CD8(+) T cells. As regards iNKT cells, their loss of function could be due to a loss of CD1d expression by the leukemic APCs expressing the BCR-ABL oncogene (Figure 5; (65)). The loss of CD1d expression could reprogram iNKT cells by favoring the loss of PLZF expression and, consequently, of IL-4, thereby decreasing their capacity to orient a differentiation of CD8(+) T cells into innate CD8(+) T cells (Figure 5).

Another, non-exclusive hypothesis is that of a loss of IL-15 expression by leukemic cells or of the leukemic milieu, as has been shown in colon cancer (66). A different study leads to the suggestion that during CML, TKI might favor the capacity of the DCs to trans-present IL-15 to T cells/NK cells (67). The scope of these works should be broadened, leading to a search for a defect in the expression and trans-presentation of IL-15 during CML-CP. Another relevant element is the loss in sensitivity to IL-15 or signalization of the latter by the innate CD8(+) T cells. Our preliminary results suggest a loss in response to IL-15 by total and innate CD8(+) T lymphocytes (Figure S4 in Supplementary Material). The possible implication of this loss of sensitivity to IL-15 in the dysregulation of the innate CD8(+) T lymphocytes during CML-CP remains to be investigated.

To conclude, CML can be considered as a model in study of the loss of innate effectors (NK cells) and innate T effectors [iNKT cells and innate CD8(+) T cells] and their relevance in the leukemic process. The escape of leukemic cells from the immune

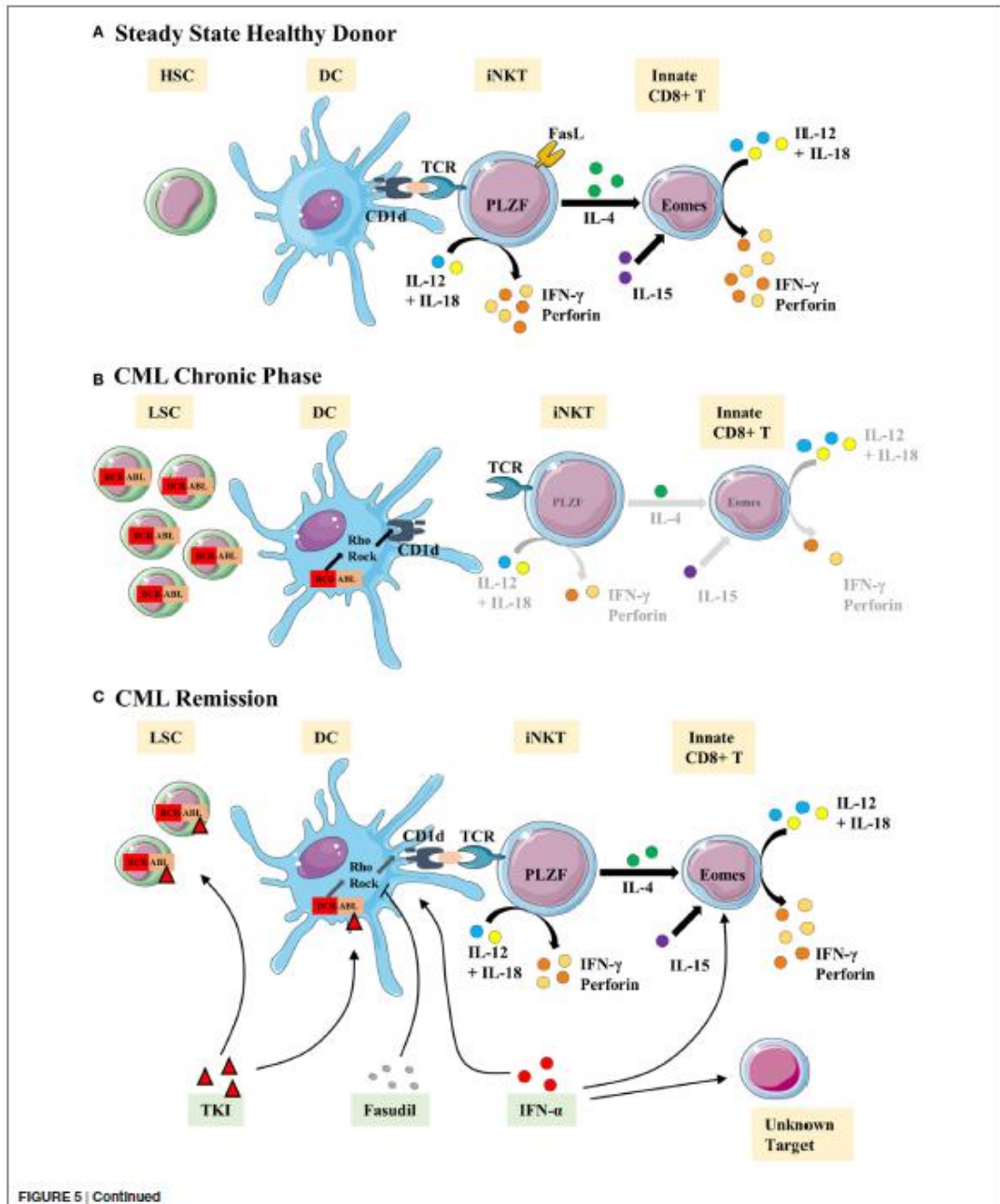
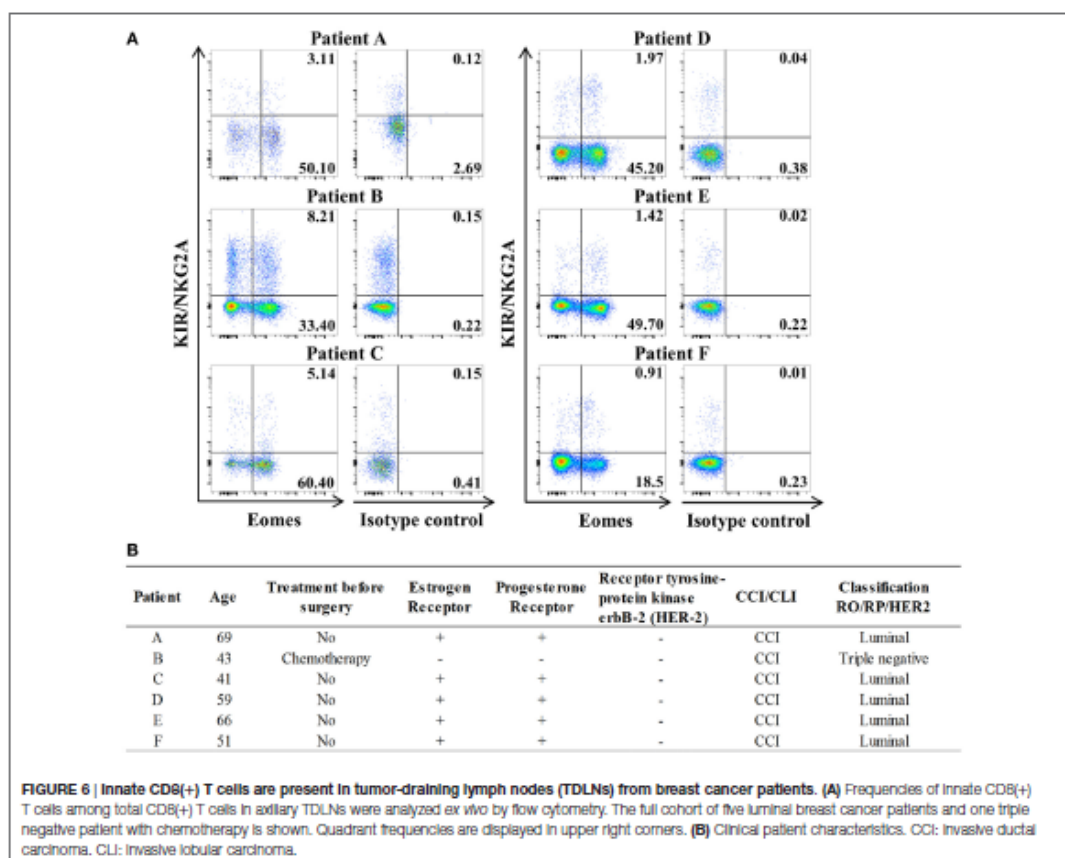


FIGURE 5 | Continued

Representative view of the INKT/Innate CD8(+) T-cell axis hypothesis in chronic myeloid leukemia (CML). We propose the following scenario in CML: **(A)** steady state/healthy situation. Normal hematopoietic stem cells (HSC) generate normal immune cells. Antigens are presented via the CD1d molecule by dendritic cells (DCs) to INKT cells. We propose that activated INKT cells produce IL-4 but the possibility of a T-cell receptor (TCR)-independent mechanism for IL-4 secretion cannot be ruled out. IL-4 is thought to take part with IL-15 in the development/homeostasis of Innate CD8(+) T cells. INKT and Innate CD8(+) T cells produce IFN- γ and perforin in response to the Innate-like IL-12 + IL-18 stimulation. **(B)** Chronic phase of CML. Leukemic stem cells (LSC) produce modified immune cells bearing BCR-ABL translocation, including DCs. Impaired CD1d antigen presentation by DCs results from activation of the Rho/Rock pathway via the DH-PH domain of the ABL part of BCR-ABL. INKT cell development/stimulation is thereby impaired, especially in terms of promyelocytic leukemia zinc-finger factor (PLZF) expression and IL-4 production. Consequently, we surmise that the Innate CD8(+) T subset is defective in number and function. **(C)** Restoration of the INKT/Innate CD8(+) T-cell axis by therapies. IFN- α therapy is thought to help restoring DCs and Innate CD8(+) T cells as well as other unidentified cells. Tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapies targeting the ABL tyrosine kinase domain clear/control the generation of LSC and abnormal immune cells, including DCs. Fasudil therapy, combined with TKI, restores the CD1d presentation by DCs to INKT cells and is one possible mechanism to restore the INKT/Innate CD8(+) T-cell axis.



system could depend on loss of the coordinated functions of the effectors of classical innate immunity and innate T-cell immunity.

Innate CD8(+) T Lymphocytes and Solid Tumors

Since we cannot rule out the possibility that the anticancer role attributed to innate CD8(+) T lymphocytes is specific to

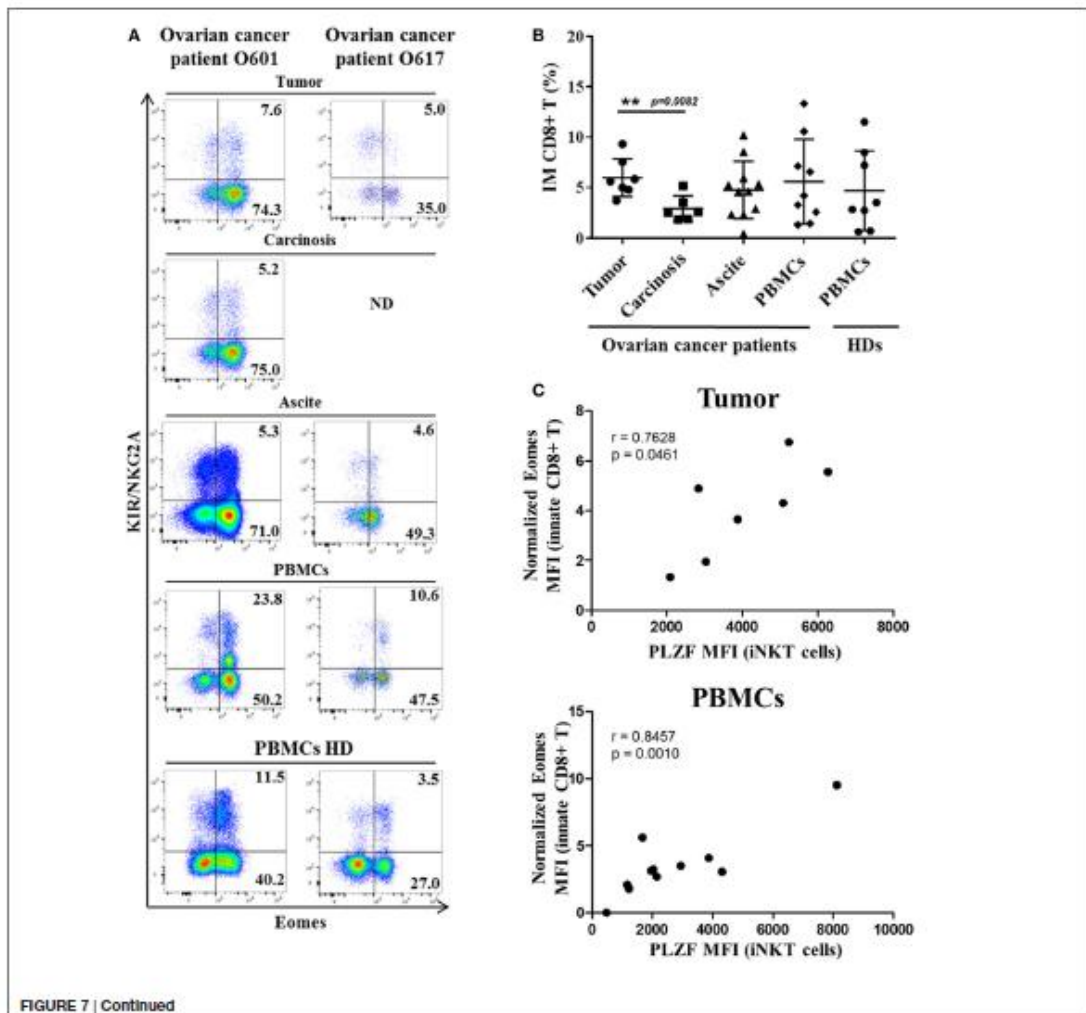
leukemia, we have sought to extend the scope of our hypothesis on the antitumor role of the innate CD8(+) T lymphocytes by assessing the presence of these cells in solid tumors or metastasized tissues. The characteristics of tumor micro-environments differ according to cancers, and it is for that reason that we have assessed the presence of innate CD8(+) T lymphocytes in two types of solid tumors: breast cancer and ovarian cancer.

Study of lymph nodes (LN) invaded by tumor cells in breast cancer has highlighted the significantly frequent presence of innate CD8(+) T lymphocytes (Figure 6). The results of this preliminary study seem to justify organization of a large-scale study on breast cancer patients aimed at determining a possible link between, on the one hand, the numerical and functional status of the innate CD8(+) T cells present in the invaded LN draining the tumor and, on the other hand, disease prognosis.

Study of intra-tumoral lymphocytes in ovarian cancer has shown the significantly frequent presence of innate CD8(+) T lymphocytes, which are also present in the peritoneal carcinosis of ovarian cancers and in ascite fluids (Figure 7). Interestingly,

there was a significant higher frequency of innate CD8(+) T lymphocytes in primitive tumors than in carcinosis (a proximity metastasis), indicating that these cells not only penetrate tumors in ovarian cancer but also might undergo immune subversion in the peritoneal environment. Moreover, like in CML, our data have shown a positive correlation between Eomes expression in innate CD8(+) T lymphocytes and PLZF expression in iNKT cells both in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and tumor material (but not in carcinosis and ascite) from ovarian cancer patients (Figure 7C).

Taken as a whole, these different results show that innate CD8(+) T lymphocytes are present in tumors and probably integrated in the dynamics of anticancer responses. However, at this



D

Patient	Age	Histology	Grade	FIGO Stage*	Node Involvement	Ca125 (U/L)
O601	76	Serous adenocarcinoma	High	IIC	No lymphadenectomy	2579
O617	81	Endometrial adenocarcinoma	Low	IIC	No lymphadenectomy	454
O596	41	Cell carcinoma arising from mature cystic teratoma	NA	Ia	No lymphadenectomy	1525
O460	52	Serous adenocarcinoma	Intermediate	IIIA	21 removed nodes / 1 node metastasis	1947
O522	72	Carcinosarcoma	NA	IIC	62 removed nodes / No metastasis	235
O722	71	Serous adenocarcinoma	High	IIC	83 removed nodes / 59 node metastasis	2900
O709	67	Serous adenocarcinoma	High	IV	No lymphadenectomy	1369
O622	61	Serous adenocarcinoma	High	IIIC	50 removed nodes / No metastasis	1226
O625	66	Serous adenocarcinoma	High	IIIC	35 removed nodes / No metastasis	188
O629	67	Serous adenocarcinoma	High	IIIC	37 removed nodes / 6 node metastasis	1790
O637	47	Serous adenocarcinoma	High	IIIC	30 removed nodes / 2 node metastasis	837
O670	44	Serous adenocarcinoma	High	IIC	30 removed nodes / 1 node metastasis	837

FIGURE 7 | Innate CD8(+) T cells are present in tumors and tumor fluids from ovarian cancer patients. Cells from tumors, carcinoma, peritoneal ascites, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from ovarian cancer patients and PBMCs from healthy individuals [healthy donors (HDs)] were analyzed *ex vivo* by flow cytometry. **(A)** Two representative samples reflecting the presence of innate CD8(+) T cells in tumor, carcinoma, peritoneal ascites, and PBMCs from ovarian cancer patients and PBMCs from two HDs. ND, not determined. **(B)** Cohort study of innate CD8(+) T-cell frequency (expressed as percentage \pm SD of T cells among total CD8(+) T cells) in tumors ($n = 7$), carcinoma ($n = 7$), peritoneal fluids ($n = 12$), and PBMCs from ovarian cancer patients ($n = 10$) and PBMCs from HDs ($n = 8$). **(C)** Eomes and promyelocytic leukemia zinc-finger factor (PLZF) expression were analyzed in innate CD8(+) T cells [CD3(+) CD8(+) KIR/NKG2A(+) Eomes(+) cells] and iNKT cells [CD3(+) 6B11(+)(+) cells], respectively. Eomes MFI values are expressed relative to that of CD45(+) CD3(-) KIR/NKG2A(-) cells. The MFI of PLZF-expressing iNKT cells correlate positively with Eomes MFI in innate CD8(+) T both in tumor and PBMCs but not in carcinoma [$r = -0.04673$, $p = 0.8853$] and ascites [$r = 0.5424$, $p = 0.2084$] from ovarian cancer patients (correlation Spearman test). **(D)** Clinical patient characteristics. NA, not available.

time, it is not possible to determine their intra-tumoral functional status and, more specifically, their prognostic usefulness.

Innate CD8(+) T Lymphocytes and Immune Exhaustion in Cancer Patients

Numerous studies have dealt with the role of Eomes in the exhaustion of CD8(+) T lymphocytes during chronic infections or cancers (68–72). Our results in healthy donors (HDs) attesting a significant proliferative response to IL-15 (Figure S4 in Supplementary Material) do not lend support to an exhaustion phenotype of innate CD8(+) T cells in normal conditions. During cancer progression, on the other hand, the elevated frequency of innate CD8(+) T lymphocytes in contact with the tumor present in severely ill patients raises the question of their possible exhausted immune-exhaustion status. Furthermore, during CML, we have observed a functional defect in the innate CD8(+) T-cell population, a finding suggesting not only that CML innate CD8(+) T cells are in the process of being exhausted but also that they could be a target of immune blocking checkpoints. Monitoring multifunctionality of immune-exhausted CD8(+) T cells co-expressing Eomes and KIR/NKG2A in patients with solid tumors and CML will help to determine whether the evasion/subversion mechanisms used by tumor cells also apply to innate CD8(+) T cells in humans. At this stage, it would be interesting to determine whether the innate CD8(+) T cells express CXCR3 and CXCR5, two chemokine receptors that were recently described as being associated with CD8(+) T lymphocytes during cancers or chronic viral infection and of which the proliferation is restored following anti-programmed cell death 1 treatment (73).

CONCLUSION

Taken together, having availed ourselves of different types of empirical data, we propose that in humans, innate CD8(+) T lymphocytes constitute a new cellular component that could have a role in antitumor immunity. Our results during CML and ovarian cancer are in favor of the existence of an axis composed of innate T cells with an antitumoral potential, which consist of iNKT cells and innate CD8(+) T lymphocytes. Differentiation of these unconventional CD8(+) T cells in humans is associated with Eomes expression and could depend on IL-4 and PLZF(+) iNKT cells. Our results suggest that during CML, these innate CD8(+) T lymphocytes could be controlled by immune checkpoints. While the results of our studies on solid cancers corroborate our hypothesis concerning the role of innate CD8(+) T lymphocytes in antitumor immunity, as of now we are unable to determine whether this role is protective, permissive, and/or detrimental in these other types of cancer.

METHODS

PBMCs from HD

Healthy donors were volunteers from the Pôle Biologie Santé (Poitiers, France). PBMCs were isolated from blood samples by density gradient centrifugation (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich), resuspended in 90% fetal calf serum with 10% DMSO, and placed in a controlled rate freezer for cryopreservation at -80°C until use. For this series of data, age range was between 21 and 65 with a sex ratio of 0.6.

Clinical Breast and Ovarian Cancer Samples

Invaded tumor-draining lymph nodes were collected from six untreated luminal breast cancer patients undergoing standard surgery at Institute Curie Hospital (Paris, France), in accordance with institutional ethical guidelines. Precisely, all patients gave informed consent in a written form in accordance with the Declaration of Helsinki for participation in this study, which was approved by the scientific committee of the Institute Curie Hospital.

Cells from tumors, carcinomatosis, peritoneal ascites, and PBMCs were collected from eight untreated patients with ovarian carcinoma undergoing standard surgery at CHU of Rennes. Human samples were obtained from the processing of biological samples through the Centre de Ressources Biologiques Santé de Rennes (BB-0033-00056). The research protocol was conducted under French legal guidelines and fulfilled the requirements of the local institutional ethics committee.

Tissue samples were cut into small fragments, digested with 0.1 mg/ml Liberase TL (Roche) in the presence of 0.1 mg/ml DNase (Roche) for 15–30 min before the addition of 20% FCS. Cells were filtered on a 40- μ m cell strainer (BD), washed, and cryopreserved for further study. Ascite cells were obtained after centrifugation (400 g, 10 min).

Experimental Studies in Animals

The 8-to-12-week-old female C57BL/6J Eomes-GFP transgenic mice (74) and BALB/c wild-type mice (Janvier) were used and bred in our animal facility (PREBIOS, Platform of Research and Experimentation in Health Biology of the University of Poitiers) under specific pathogen-free conditions. Spleen and thymus were collected immediately after cervical dislocation. Splenocytes and thymocytes were isolated and analyzed *ex vivo* by flow cytometry. In some experiments, splenocytes were cultured for 16 h in the presence of 20 ng/ml of each cytokine (IL-12: R&D Systems; IL-18: MBL International) prior to analysis by flow cytometry. All procedures were performed in accordance with the recommendations of the European Accreditation of Laboratory Animal Care and French institutional committee of Poitou-Charentes (COMETHEA, C2EA-84, no. 2016072216352833).

Cell Culture and Functional Assays

Peripheral blood mononuclear cells (1×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS and antibiotics. For IL-12 + IL-18 or IL-15 stimulation, PBMCs from HD were seeded at 1.10^6 cells/ml into 24-well plates and incubated for 48 h with 20 ng/ml of each cytokine (IL-12: R&D Systems; IL-18: MBL International; IL-15: Miltenyi). Golgistop (BD Biosciences) was added for the last 5 h of culture for IL-12 + IL-18 stimulation.

Flow Cytometry

In humans, phenotypic analysis of cells from HD or breast/ovarian cancer patients was performed by flow cytometry either *ex vivo* or after culture. Expression of different markers was assessed by staining with appropriate combinations of the

following antibodies (mAbs): anti-TCR- $\alpha\beta$ BV421 (clone: IP26, BioLegend), anti-CD8 PE-Cy7 (clone: RPA-T8, BioLegend), anti-IFN- γ FITC (clone: B27, BioLegend), anti-TCR-V α 7.2 BV421 (clone: 3C10, BioLegend), anti-CD161 PerCP-Cy5.5 (clone: HP-3G10, BioLegend), and anti-Eomes eFluor[®] 660 (clone: WD1928, eBiosciences). KIR/NKG2A referred to staining with the mix of the three following antibodies from Miltenyi Biotec: anti-KIR2D PE (clone: NKVFS1), anti-KIR3DL1/KIR3DL2 (CD158e/k) PE (clone: 5.133), and anti-NKG2A (CD159a) PE (clone: REA110). For nuclear Eomes staining and intracytoplasmic IFN- γ staining, cells were permeabilized with an anti-human FoxP3 staining kit (eBioscience) and a Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences), respectively.

In mice, splenocytes and thymocytes were stained with appropriate combinations of the following antibodies: anti-TCR- β PerCP-Cy5.5 (clone: H57-597, BD Biosciences), anti-CD8 BV510 (clone: 53-6.7, BD Biosciences), anti-CD44 PE-Cy7 (clone: IM7, BD Biosciences), anti-CD49d Vioblue (clone: R1-2, Miltenyi Biotec), anti-CD122 APC (clone: TM-B1, BioLegend), anti-CD4 PE (clone: RM4-5, BD Biosciences), anti-CD24 PE (clone: M1/69, BD Biosciences), and anti-Eomes AF488 (clone: Dan11mag, eBioscience). For nuclear Eomes staining and intracytoplasmic IFN- γ staining, cells were permeabilized with an anti-human FoxP3 staining kit (eBioscience).

Dead cells were excluded using the Live/Dead[®] Fixable NearIR Dead Cell Stain kit (Life Technologies). Cells were analyzed on a Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) or a FACSVerser[™] cytometer with FACSuite[™] software (BD Biosciences) using FlowJo v10 (TreeStar, Inc.).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software). The statistical significance of differences and of mean values was analyzed by the two-tailed Wilcoxon test in **Figure 3**, paired *t*-test in **Figure 4**, and Mann–Whitney non-parametric test in **Figure 7**. Results were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

ETHICS STATEMENT

All patients gave informed consent in a written form in accordance with the recommendations of “the Declaration of Helsinki” for participation in the study, which was approved by the scientific committees of the Clinic Investigator Center Inserm CIC-1402 (Poitiers, France), the Biological Resource Center of CHU of Poitiers (NF S96-900 certification since February 2014), the Biological Resource Center of CHU of Rennes (NF S96-900, certification since May 2009), and the Institute Curie Hospital (Paris, France).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AB, EC, and FJ designed the experiments, performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. LL, MA, NN, NP, BM, and SB contributed to sample preparation from patients and healthy controls, designed the experiments, performed the experiments, and analyzed and

interpreted the data. EP, VC, and VL provided clinical samples and contributed to the interpretation of data. AH and J-MG together were responsible for the overall study design, supervised the project, and took primary responsibility for writing the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are especially indebted to Jeffrey Arsham for editing the English of their manuscript. They acknowledge Thierry Walzer (Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111-CNRS UMR 5308, Lyon, France) for the kind gift of Eomes-GFP mice. They thank Christine Sedlik (Institut Curie, Paris, France) for fruitful discussions and help with samples from breast cancer patients. They thank Image UP (Université de

Poitiers) flow cytometry core facilities. This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer du Grand Ouest (Comités départementaux de la Vienne, de la Charente, de la Charente Maritime et des Deux-Sèvres), Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes (ARIM-PC), les Régions Aquitaine Limousin Poitou-Charentes, Bretagne, Centre et Pays de la Loire (PlasTICO project), Association Laurette Fugain, Ministère de la Recherche, Sport and Collection, and INCa-DGOS 8658 (PRT-K 2015-052).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00316/full#supplementary-material>.

REFERENCES

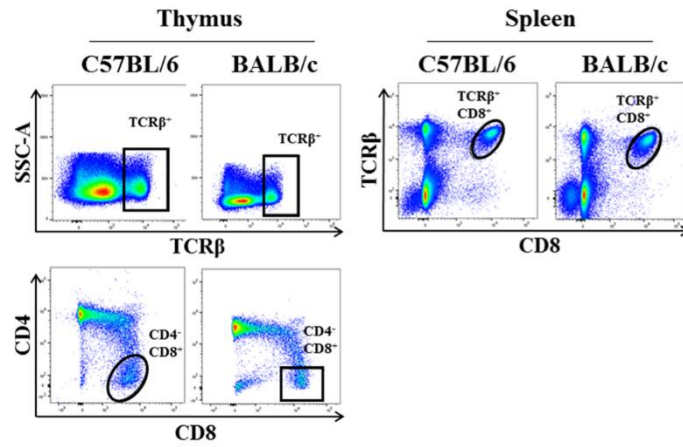
- Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol* (2015) 16:1114–23. doi:10.1038/ni.3298
- Lanier LL. Shades of grey – the blurring view of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* (2013) 13:73–4. doi:10.1038/nri3389
- Jameson SC, Lee YJ, Hogquist KA. Innate memory T cells. *Adv Immunol* (2015) 126:173–213. doi:10.1016/bs.ai.2014.12.001
- Van Kaer L. Innate and virtual memory T cells in man. *Eur J Immunol* (2015) 45:1916–20. doi:10.1002/eji.201545761
- Berg RE, Cordes CJ, Forman J. Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN-gamma secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur J Immunol* (2002) 32:2807–16. doi:10.1002/1521-4141(200210)32:10<2807::AID-IMMU2807>3.0.CO;2-0
- Berg RE, Crossley E, Murray S, Forman J. Memory CD8+ T cells provide innate immune protection against *Listeria monocytogenes* in the absence of cognate antigen. *J Exp Med* (2003) 198:1583–93. doi:10.1084/jem.20031051
- Su J, Berg RE, Murray S, Forman J. Thymus-dependent memory phenotype CD8 T cells in naive B6.H-2Kb-/-Db-/- animals mediate an antigen-specific response against *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* (2005) 175:6450–7. doi:10.4049/jimmunol.175.10.6450
- Atherly LO, Lucas JA, Felices M, Yin CC, Reiner SL, Berg LJ. The Tec family tyrosine kinases Itk and Rlk regulate the development of conventional CD8+ T cells. *Immunity* (2006) 25:79–91. doi:10.1016/j.immuni.2006.05.012
- Broussard C, Fleischacker C, Horai R, Chetana M, Venegas AM, Sharp LL, et al. Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk. *Immunity* (2006) 25:93–104. doi:10.1016/j.immuni.2006.05.011
- Horai R, Mueller KL, Handon RA, Cannons JL, Anderson SM, Kirby MR, et al. Requirements for selection of conventional and innate T lymphocyte lineages. *Immunity* (2007) 27:775–85. doi:10.1016/j.immuni.2007.09.012
- Hu J, Sahu N, Walsh E, August A. Memory phenotype CD8+ T cells with innate function selectively develop in the absence of active Itk. *Eur J Immunol* (2007) 37:2892–9. doi:10.1002/eji.200737311
- Schaeffer EM, Broussard C, Debnath J, Anderson S, McVicar DW, Schwartzberg PL. Tec family kinases modulate thresholds for thymocyte development and selection. *J Exp Med* (2000) 192:987–1000. doi:10.1084/jem.192.7.987
- Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, et al. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and Eomesodermin. *Nat Immunol* (2005) 6:1236–44. doi:10.1038/ni1268
- Sosinowski T, White JT, Cross EW, Haluszczak C, Marrack P, Gapin L, et al. CD8 α + dendritic cell trans presentation of IL-15 to naive CD8+ T cells produces antigen-inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function. *J Immunol* (2013) 190:1936–47. doi:10.4049/jimmunol.1203149
- Zhou X, Yu S, Zhao D-M, Harty JT, Badovinac VP, Xue H-H. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* (2010) 33:229–40. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.002
- Prince AL, Kraus Z, Carty SA, Ng C, Yin CC, Jordan MS, et al. Development of innate CD4+ and CD8+ T cells in Itk-deficient mice is regulated by distinct pathways. *J Immunol* (2014) 193:688–99. doi:10.4049/jimmunol.1302059
- Cho H, Bediako Y, Xu H, Choi H-J, Wang C-R. Positive selecting cell type determines the phenotype of MHC class Ib-restricted CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108:13241–6. doi:10.1073/pnas.1105118108
- Kim H-J, Verbinnen B, Tang X, Lu L, Cantor H. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature* (2010) 467:328–32. doi:10.1038/nature09370
- Urdahl KB, Sun JC, Bevan MJ. Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells. *Nat Immunol* (2002) 3:772–9. doi:10.1038/ni814
- Akue AD, Lee J-Y, Jameson SC. Derivation and maintenance of virtual memory CD8 T cells. *J Immunol* (2012) 188:2516–23. doi:10.4049/jimmunol.1102213
- Haluszczak C, Akue AD, Hamilton SE, Johnson LDS, Pujanauski L, Teodorovic L, et al. The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J Exp Med* (2009) 206:435–48. doi:10.1084/jem.20081829
- Lee J-Y, Hamilton SE, Akue AD, Hogquist KA, Jameson SC. Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:13498–503. doi:10.1073/pnas.1307572110
- Marshall HD, Prince AL, Berg LJ, Welsh RM. IFN-alpha beta and self-MHC divert CD8 T cells into a distinct differentiation pathway characterized by rapid acquisition of effector functions. *J Immunol* (2010) 185:1419–28. doi:10.4049/jimmunol.1001140
- Martinet V, Tonon S, Torres D, Azouz A, Nguyen M, Kohler A, et al. Type I interferons regulate Eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells. *Nat Commun* (2015) 6:7089. doi:10.1038/ncomms8089
- Becker TC, Coley SM, Wherry EJ, Ahmed R. Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells. *J Immunol* (2005) 174:1269–73. doi:10.4049/jimmunol.174.3.1269
- Cho BK, Rao VP, Ge Q, Eisen HN, Chen J. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J Exp Med* (2000) 192:549–56. doi:10.1084/jem.192.4.549
- Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* (2000) 192:557–64. doi:10.1084/jem.192.4.557
- Murali-Krishna K, Ahmed R. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J Immunol* (2000) 165:1733–7. doi:10.4049/jimmunol.165.4.1733

29. Huang W, Hu J, August A. Cutting edge: innate memory CD8+ T cells are distinct from homeostatic expanded CD8+ T cells and rapidly respond to primary antigenic stimuli. *J Immunol* (2013) 190:2490–4. doi:10.4049/jimmunol.1202988
30. Renkema KR, Li G, Wu A, Smithy MJ, Nikolich-Zugich J. Two separate defects affecting true naive or virtual memory T cell precursors combine to reduce naive T cell responses with aging. *J Immunol* (2014) 192:151–9. doi:10.4049/jimmunol.1301453
31. Arlettaz L, Degermann S, De Rham C, Roosnek E, Huard B. Expression of inhibitory KIR is confined to CD8+ effector T cells and limits their proliferative capacity. *Eur J Immunol* (2004) 34:3413–22. doi:10.1002/eji.200324756
32. Arlettaz L, Villard J, de Rham C, Degermann S, Chapuis B, Huard B, et al. Activating CD94: NKG2C and inhibitory CD94: NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alpha beta lymphocytes. *Eur J Immunol* (2004) 34:3456–64. doi:10.1002/eji.200425210
33. Björkström NK, Béziat V, Cichocki F, Liu LL, Levine J, Larsson S, et al. CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. *Blood* (2012) 120:3455–65. doi:10.1182/blood-2012-03-416867
34. Huard B, Karlsson L. A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur J Immunol* (2000) 30:1665–75. doi:10.1002/1521-4141(200006)30:6<1665::AID-IMMU1665>3.0.CO;2-2
35. van Veken LT, Diez Campelo M, van der Hoorn MA, Hagedoorn RS, van Egidmond HM, van Bergen J, et al. Functional analysis of killer Ig-like receptor-expressing cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* (2009) 182:92–101. doi:10.4049/jimmunol.182.1.92
36. Warren HS, Rana PM, Rieger DT, Hewitt KA, Dahlstrom JE, Kent AL. CD8 T cells expressing killer Ig-like receptors and NKG2A are present in cord blood and express a more naive phenotype than their counterparts in adult blood. *J Leukoc Biol* (2006) 79:1252–9. doi:10.1189/jlb.0905536
37. Guia S, Cognet C, de Beaucoudrey L, Tessmer MS, Jouanguy E, Berger C, et al. A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo. *Blood* (2008) 111:5008–16. doi:10.1182/blood-2007-11-122259
38. Jacomot F, Cayssials E, Basbous S, Levescot A, Piccirilli N, Desmier D, et al. Evidence for Eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. *Eur J Immunol* (2015) 45:1926–33. doi:10.1002/eji.201545539
39. Wencker M, Turchinovich G, Di Marco Barros R, Deban L, Jandke A, Cope A, et al. Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness. *Nat Immunol* (2014) 15:80–7. doi:10.1038/ni.2773
40. Min HS, Lee YJ, Jeon YK, Kim EJ, Kang BH, Jung KC, et al. MHC class II-restricted interaction between thymocytes plays an essential role in the production of innate CD8+ T cells. *J Immunol* (2011) 186:5749–57. doi:10.4049/jimmunol.1002825
41. Jacomot F, Cayssials E, Barbarin A, Desmier D, Basbous S, Lefèvre L, et al. The hypothesis of the human iNKT/innate CD8(+) T-cell axis applied to cancer: evidence for a deficiency in chronic myeloid leukemia. *Front Immunol* (2016) 7:688. doi:10.3389/fimmu.2016.00688
42. Goplen NB, Saxena V, Knudson KM, Schrum AG, Gil D, Daniels MA, et al. IL-12 signals through the TCR to support CD8 innate immune responses. *J Immunol* (2016) 197:2434–43. doi:10.4049/jimmunol.1600037
43. Gao Y, Williams AP. Role of innate T cells in anti-bacterial immunity. *Front Immunol* (2015) 6:302. doi:10.3389/fimmu.2015.00302
44. Denucci CC, Mitchell JS, Shimizu Y. Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there. *Crit Rev Immunol* (2009) 29:87–109. doi:10.1615/CritRevImmunol.v29.i2.10
45. Martin-Blondel G, Pignolet B, Tietz S, Yahii I, Gebauer C, Perinat T, et al. Migration of encephalitogenic CD8 T cells into the central nervous system is dependent on the $\alpha 4 \beta 1$ -integrin. *Eur J Immunol* (2015) 45:3302–12. doi:10.1002/eji.201545632
46. Polman C, Schellekens H, Killestein J. Neutralizing antibodies to interferon-beta may persist after cessation of therapy: what impact could they have? *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* (2006) 12:245–6. doi:10.1191/135248506msl284ed
47. Chen Y, Bord E, Tompkins T, Miller J, Tan CS, Kinkel RP, et al. Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with natalizumab. *N Engl J Med* (2009) 361:1067–74. doi:10.1056/NEJMoa0904267
48. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* (2006) 311:1924–7. doi:10.1126/science.1122927
49. Ueda N, Kuki H, Kamimura D, Sawa S, Seino K, Tashiro T, et al. CD1d-restricted NKT cell activation enhanced homeostatic proliferation of CD8+ T cells in a manner dependent on IL-4. *Int Immunol* (2006) 18:1397–404. doi:10.1093/intimm/dxk073
50. Morris SC, Heidorn SM, Herbert DR, Perkins C, Hildeman DA, Khodoun MV, et al. Endogenously produced IL-4 nonredundantly stimulates CD8+ T cell proliferation. *J Immunol* (2009) 182:1429–38. doi:10.4049/jimmunol.182.3.1429
51. Mbitikon-Kobo F-M, Vocanson M, Michallet M-C, Tomkowiak M, Cottalorda A, Angelov GS, et al. Characterization of a CD44/CD122int memory CD8 T cell subset generated under sterile inflammatory conditions. *J Immunol* (2009) 182:3846–54. doi:10.4049/jimmunol.0802438
52. Vervakakis M, Boos MD, Bendelac A, Kee BL. SAP protein-dependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(+) T cells with innate lymphocyte characteristics. *Immunity* (2010) 33:203–15. doi:10.1016/j.immuni.2010.07.013
53. Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nat Immunol* (2010) 11:709–16. doi:10.1038/ni.1898
54. Lee A, Park SP, Park CH, Kang BH, Park SH, Ha S-J, et al. IL-4 induced innate CD8+ T cells control persistent viral infection. *PLoS Pathog* (2015) 11:e1005193. doi:10.1371/journal.ppat.1005193
55. Fujii S-I, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motobashi S, et al. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front Immunol* (2013) 4:409. doi:10.3389/fimmu.2013.00409
56. Crowe NY, Smyth MJ, Godfrey DI. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med* (2002) 196:119–27. doi:10.1084/jem.20020092
57. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* (2000) 191:661–8. doi:10.1084/jem.191.4.661
58. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* (2001) 97:192–7. doi:10.1182/blood.V97.1.192
59. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol* (2014) 89:547–56. doi:10.1002/ajh.23691
60. Guilhot F, Roy L, Saulnier P-J, Guilhot J, Barra A, Gombert J-M, et al. Immunotherapeutic approaches in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* (2008) 49:629–34. doi:10.1080/10428190801927510
61. Mohty M, Jourdan E, Marni NB, Vey N, Dumaj G, Blaise D, et al. Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* (2004) 103:4666–8. doi:10.1182/blood-2003-09-3220
62. Verfaillie C, Kay N, Miller W, McGlave P. Diminished A-LAK cytotoxicity and proliferation accompany disease progression in chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1990) 76:401–8.
63. Rossignol A, Levescot A, Jacomot F, Robin A, Basbous S, Giraud C, et al. Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Immunol* (2012) 42:1870–5. doi:10.1002/eji.201142043
64. Wingender G, Krebs P, Beutler B, Kronenberg M. Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency. *J Immunol* (2010) 185:2721–9. doi:10.4049/jimmunol.1001018
65. Basbous S, Levescot A, Piccirilli N, Brizard E, Guilhot F, Roy L, et al. The Rho-ROCK pathway as a new pathological mechanism of innate immune subversion in chronic myeloid leukaemia. *J Pathol* (2016) 240:262–8. doi:10.1002/path.4779
66. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Sasso MS, Obenaus AC, Fredriksen T, et al. Functional network pipeline reveals genetic determinants associated with in situ lymphocyte proliferation and survival of cancer patients. *Sci Transl Med* (2014) 6:228ra37. doi:10.1126/scitranslmed.3007240

67. Powers JJ, Dubovsky JA, Epling-Burnette PK, Moscinski L, Zhang L, Mustjoki S, et al. A molecular and functional analysis of large granular lymphocyte expansions in patients with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma* (2011) 52:668–79. doi:10.3109/10428194.2010.550074
68. Wherry EJ, Ha S-J, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* (2007) 27:670–84. doi:10.1016/j.immuni.2007.09.006
69. Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, Johnnidis JB, Dolfi DV, Barnett BE, et al. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* (2012) 338:1220–5. doi:10.1126/science.1229620
70. Gill S, Vasey AE, De Souza A, Baker J, Smith AT, Kohrt HE, et al. Rapid development of exhaustion and down-regulation of Eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. *Blood* (2012) 119:5758–68. doi:10.1182/blood-2012-03-415364
71. Lu B, Chen L, Liu L, Zhu Y, Wu C, Jiang J, et al. T-cell-mediated tumor immune surveillance and expression of B7 co-inhibitory molecules in cancers of the upper gastrointestinal tract. *Immunol Res* (2011) 50:269–75. doi:10.1007/s12026-011-8227-9
72. Dielmann A, Letsch A, Nonnenmacher A, Miller K, Keilholz U, Busse A. Favorable prognostic influence of T-box transcription factor Eomesodermin in metastatic renal cell cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* (2016) 65:181–92. doi:10.1007/s00262-015-1786-1
73. Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, Lee J, Kissick HT, Burger MC, et al. Defining CD8(+) T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* (2016) 537:417–21. doi:10.1038/nature19330
74. Daussey C, Faure F, Mayol K, Viel S, Gasteiger G, Charrier E, et al. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J Exp Med* (2014) 211:563–77. doi:10.1084/jem.20131560

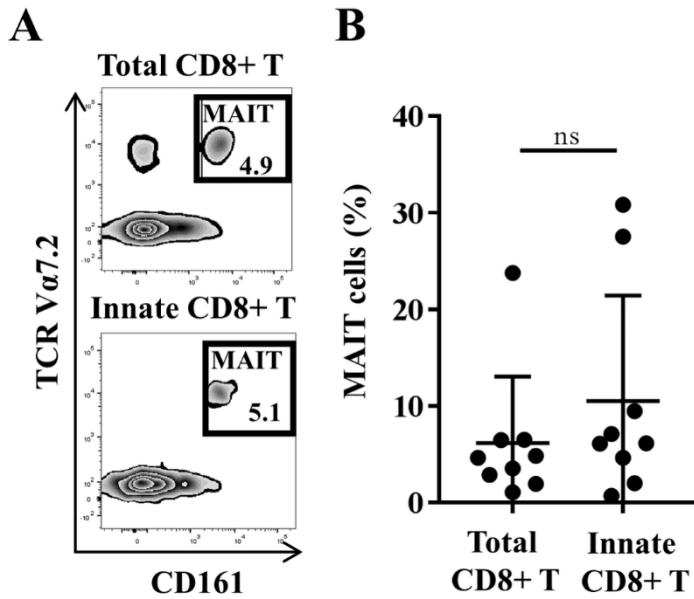
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Barbarin, Cayssials, Jacomet, Nunez, Basbous, Lefèvre, Abdallah, Piccirilli, Morin, Lavoue, Catros, Piaggio, Herbelin and Gombert. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



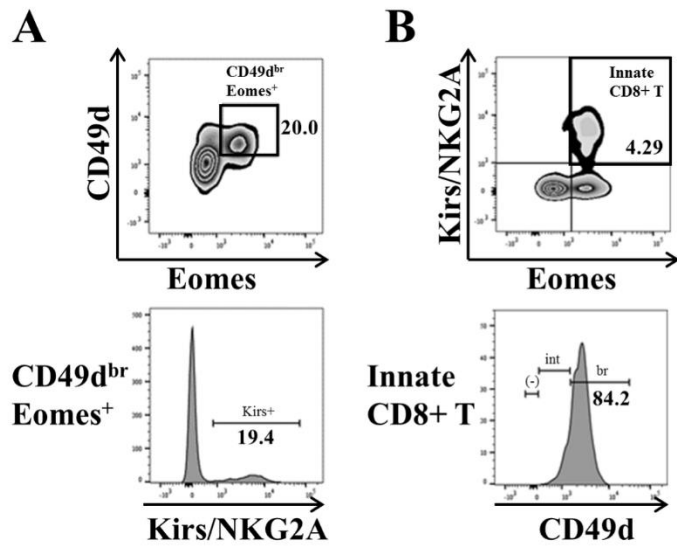
Supplemental Figure 1

Gating strategy for total T CD8(+) cells in C57BL/6 and BALB/c mice. Total T CD8(+) cells were defined as TCRβ(+) CD4(-) CD8(+) and as TCRβ(+) CD8(+) in the thymus (left panel) and in the spleen (right panel), respectively.



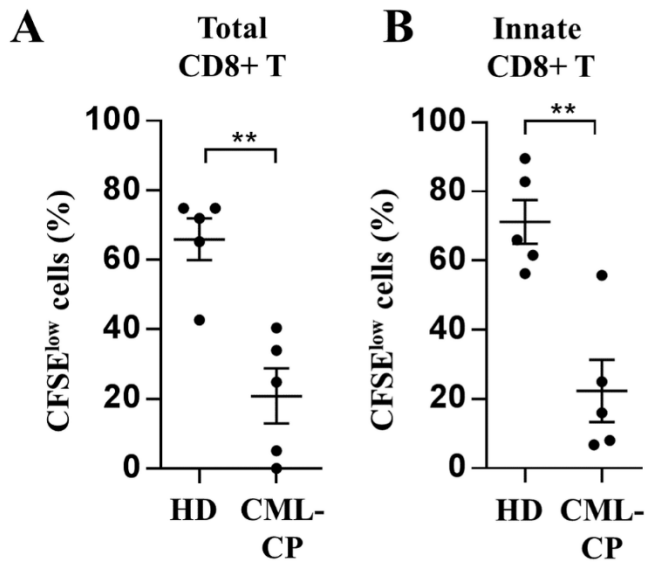
Supplemental Figure 2

Innate CD8(+) T cells comprise a small fraction of MAIT cells. PBMCs from healthy donors (n=9) were analyzed *ex vivo* by flow cytometry. **(A)** One representative sample is shown for MAIT (CD161(bright) TCR-V α 7.2(+)) cells among total (upper panel) and innate (lower panel) CD8(+) T cell subsets. Frequency of MAIT cells is displayed in the gate. **(B)** Full cohort is shown for the percentage of MAIT cells among total and innate CD8(+) T cells. Statistical analysis: Wilcoxon test, ns: non significant.



Supplemental Figure 3

CD49d^{br} cells contains only a part of innate CD8(+) T cells. PBMCs from one representative healthy donor were analyzed *ex vivo* by flow cytometry after gating on CD3(+) CD8(+) T cells. CD49d^{br} Eomes(+) cells contain less than 20% of innate T CD8(+) cells based on Kirs/NKG2A expression (**A**), while innate CD8(+) T cells are mainly CD49^{br} (**B**).



Supplemental Figure 4

Loss of response to IL-15 by CD8(+) T cells and innate CD8(+) T cells in CML-CP patients. PBMCs from five healthy donors and five CML-CP patients were labeled with CFSE, cultured 7 days in the presence of IL-15 (20 ng/ml) and then analyzed by flow cytometry after gating on CD3(+) CD8(+) T cells. Percentage (mean \pm SEM) of CFSE^{low} cells are shown for total (**A**) and innate (**B**) T CD8(+) cells. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney test, ** $p < 0.01$.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les options utilisées dans la lutte anticancéreuse font désormais appel, non seulement à la chimiothérapie traditionnelle, mais également à des traitements immunomodulateurs visant à booster/réactiver la réponse immunitaire antitumorale. Les LT conventionnels concentrent depuis de nombreuses années les stratégies d'immunothérapies développées dans le domaine de l'immuno-oncologie avec notamment l'essor des agents ciblant les ICP (pour *immune check-points*). Les molécules bloquant l'activité des ICP inhibiteurs CTLA-4 et PD-1, dénommées ICI (pour ICP *inhibitors*), en l'occurrence les AC anti-CTLA-4, anti-PD-1 et anti-PD-L1, permettent de réactiver la réponse immunitaire antitumorale et sont la tête de pont de cette révolution de l'immunothérapie.

Cependant, les cellules cancéreuses peuvent échapper à la reconnaissance et à la destruction par les LT en exprimant à leur surface des antigènes d'origine endogène de faible immunogénicité et en perdant l'expression des molécules du CMH de classe I. Par conséquent, on assiste dans de nombreux cancers, tels que les lymphomes non hodgkiniens (Ansell, 2017), non pas à la mise en place d'une réponse T effectrice, mais à l'instauration d'une tolérance immunologique vis-à-vis de la tumeur. Dans ce contexte, les stratégies visant à promouvoir l'activité antitumorale des effecteurs du SI inné suscitent un vif intérêt. A titre d'exemple, des molécules, en ciblant l'interaction entre CD47 à la surface des cellules tumorales et SIRP α à la surface des macrophages visent à rétablir l'activité de phagocytose des cellules cancéreuses (Tun Am and Ansell Sm, 2020). Les cellules NK font aussi l'objet de stratégies innovantes pour faciliter/amplifier leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales telles que les AC bispécifiques (par exemple l'AFM 13 qui relie CD30 exprimé à la surface des cellules lymphomateuses et le récepteur CD16A des NK (Tun Am and Ansell Sm, 2020) ou encore les CAR-NK. En parallèle, nos connaissances sur les LT innés progressent et il existe un intérêt croissant pour ces LT en raison de leurs propriétés fonctionnelles de type « *NK-like* » et des

applications potentielles qui en découlent pour le traitement des cancers. Certains essais cliniques portant notamment sur les iNKT et les LT- $\gamma\delta$ ont été menés (cf. Introduction Générale ; chapitres III.1.4 et III.2.2).

De manière intéressante, des LT CD8 naïfs capables d'acquérir un phénotype mémoire/activé en l'absence de contact et de reconnaissance d'un antigène étranger ont été décrits chez la Souris, et dénommés « *antigen inexperienced memory phenotype T-cells* ». Si le phénotype mémoire est acquis par les LT CD8 au cours du processus de différenciation thymique, on parle de LT CD8 IM. Tandis que si ce phénotype résulte d'une reprogrammation en périphérie, on parle de LT CD8 VM. Les LT CD8 IM et VM possèdent des propriétés fonctionnelles *NK-like*, les rendant capables de s'activer de manière indépendante de leur TCR, c'est-à-dire de la reconnaissance d'un antigène présenté par des molécules du CMH de classe I. Soulignons, de plus, qu'une première preuve expérimentale de leur implication dans l'immunité antitumorale a été très récemment apportée chez la Souris (Miller et al., 2020). Chercher à identifier de telles populations de LT innés chez l'Homme prend tout son sens dans une stratégie de recherche d'effecteurs antitumoraux dotés de fonctions innés à cibler/valoriser.

Notre laboratoire s'inscrit depuis une dizaine d'années dans cette démarche et a été capable d'imposer les LT CD8 innés comme un équivalent humain des LT CD8 IM/VM (Jacomet et al., 2015; Kaer, 2015). La description des LT CD8 innés chez l'Homme demeure à approfondir tandis que leur implication dans l'immunité antitumorale et le développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'exploitation de leur fonctions *NK-like* sont à éprouver.

LES LT CD8 INNÉS EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES CHEZ L'HOMME

Les LT CD8 innés (cellules T TCR- $\alpha\beta^+$ CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺), que nous avons identifiés chez le sujet sain représentent un potentiel équivalent humain des LT CD8 IM décrits chez la Souris (Jacomet et al., 2015; Kaer, 2015).

I.1. CD49d, une signature des LT CD8 innés chez l'Homme ?

Chez la souris, les LT CD8 IM sont caractérisés par l'expression de CD49d ; par analogie, nous avons étudié l'expression de CD49d par les LT CD8 innés chez l'Homme. De manière intéressante, le contingent LT CD8 inné exprime fortement ce marqueur et son niveau d'expression est clairement associé à leur statut de LT inné (sécrétion d'IFN- γ en réponse à IL-12+IL-18), il peut ainsi, de manière remarquable, faire office de signature fonctionnelle des LT CD8 innés. Cependant, ce marqueur ne permet pas de délimiter le contingent LT CD8 inné dans le sang périphérique chez l'Homme sans l'utilisation des marqueurs Eomes et KIR/NKG2A. Ce point aurait été pourtant d'un intérêt expérimental majeur pour trier au sein des LT CD8 totaux, notre contingent d'intérêt LT CD8 inné, sur la base de marqueurs membranaires exclusifs et donc sans perméabilisation, laquelle compromet des analyses fonctionnelles ultérieures après tri cellulaire.

I.2. Répertoire TCR des LT CD8 innés, comment examiner son caractère autoréactif ?

De nouvelles données sur l'ontogénie et la spécificité antigénique des LT CD8 IM ont été très récemment publiées chez la Souris. Leur développement comprend, à l'instar des LTreg Foxp3⁺, une étape thymique faisant interagir leur TCR avec des ligands endogènes au sein de niches « spécifiques ». Leur TCR a une diversité de répertoire restreinte et de caractère auto réactif (Miller et al., 2020). Nous postulons que le répertoire TCR des LT CD8 innés possède ces mêmes caractéristiques chez le sujet sain adulte.

Pour questionner, chez l'Homme, le caractère autoréactif du TCR des LT CD8 innés, nous proposons d'incuber des PBMC (pour *peripheral blood mononuclear cell*) avec des tétramères HLA-A*0201 chargés de peptides endogènes dérivés du FBA (pour *fructose biphosphonate aldolase*) et de la kératine (KER) (Barnea et al, 2002, Weinschenk et al, 2002) puis d'analyser la fréquence des LT CD8 innés au sein du pool de cellules tétramères positives. Pour tester directement chez l'Homme, le phénomène de tolérance vis-à-vis de LT CD8 innés auto-réactifs au stade de la sélection thymique, nous mesurerons la fréquence des LT CD8 innés reconnaissant un épitope « mâle » spécifique du chromosome Y, dénommé SMCY (équivalent du H-Y murin) chez des sujets HLA-A*0201⁺ (meadows et al 1997). En comparant les données obtenues chez les hommes et les femmes, nous pourrions estimer la proportion de LT CD8 innés spécifiques de SMCY qui échappe au phénomène de délétion clonale chez les hommes.

Des expériences complémentaires pourront être réalisées à partir de cellules mononucléées du sang de cordon placentaire. En effet, le sang de cordon est un système qui, par définition, est enrichi en LT mémoires de type IM (Jacomet et al., 2015; Min et al., 2011; Warren Hs et al., 2006). Les résultats seraient encore plus robustes si cette réactivité vis-à-vis d'antigènes du soi était testée à partir de thymocytes CD8 innés. Il faudrait, dans ce cas, envisager de disposer de prélèvements thymiques à la suite de la réalisation de chirurgie cardiaque chez le nouveau-né.

I.3. Perte du potentiel prolifératif des LT CD8 VM chez l'Homme et la Souris avec l'avancée en âge : sénescence ou exhaustion ?

Quinn *et al.* ont rapporté en 2018, chez la Souris, que les LT CD8 VM (CD44^{hi}CD49d^{lo}) perdaient avec l'âge leurs capacités à proliférer en réponse à une stimulation polyclonale de leur TCR (stimulation anti-CD3 ϵ , anti-CD8 α , et anti-CD11a en présence d'IL-2), lesquelles sont en revanche maintenues en réponse à l'IL-15. De manière intéressante, ce défaut prolifératif *via* le TCR n'est pas restauré après transfert adoptif de LT CD8 VM de souris

« âgées » chez des souris « jeunes », indiquant l'origine intrinsèque de ce dysfonctionnement. Les auteurs ont aussi documenté par des analyses transcriptomiques et phénotypiques que les LT CD8 VM des souris « âgées » avaient un profil de type « sénescence » plutôt que d'« exhaustion ». Leurs données publiées chez l'Homme, montrent, à l'instar des observations faites chez la Souris, que la prolifération des LT CD8 VM (CD45RA⁺ PanKIR/NKG2A⁺) en réponse à une stimulation polyclonale de leur TCR (anti-CD3ε, anti-CD11a) est fortement réduite tandis que celle des LT CD8 « *central memory* » (CD45RA^{lo}, CD27^{hi}) et LT CD8 « *effector memory* » (CD45RA^{lo} CD27^{lo}) est conservée.

Nous proposons d'étudier chez l'Homme en fonction de la catégorie d'âge (18-30 ans *versus* 60-80 ans) la prolifération de notre contingent d'intérêt (LT CD8 inné) en réponse à une stimulation TCR polyclonale, parallèlement à l'étude de leur capacité d'expression de l'IFN-γ en réponse à une stimulation de type IL-12+18 (fonction *innate-like*). En effet, dans le contexte de la LMC au diagnostic, nous avons observé une dissociation entre leur statut fonctionnel adaptatif *versus* inné, avec un potentiel de réponse à une stimulation médiée par le TCR conservé *versus* un potentiel de réponse à une stimulation de type *innate-like* quasi inexistant (**Manuscrit 1**).

Nous pourrions également utiliser le marqueur cytosolique γ-H2AX qui signe des événements de cassure et de réparation de l'ADN et qui a décrit comme une signature phénotypique de sénescence pour étudier le profil des LT CD8 innés.

LT CD8 INNÉS ET CANCERS

Ce n'est qu'en 2020 qu'une implication des LT CD8 IM dans l'immunité antitumorale a été mise en évidence chez la Souris, ceci dans un modèle de cancer de prostate (Miller et al., 2020). Ainsi, le statut d'effecteur antitumoral des LT CD8 IM reste largement à étudier chez la Souris. Nous avons émis l'hypothèse que les LT CD8 innés qui présentent des propriétés

phénotypiques et fonctionnelles communes avec les LT CD8 IM décrites chez la Souris, ainsi qu'avec les cellules NK, pourraient, à l'instar des autres populations LT innées du gradient « *innateness* » jouer un rôle dans l'immunité antitumorale.

I.1. Les LT CD8 innés et la réponse anti-leucémique au cours de la LMC

I.1.1. Quelle signification donnée aux défaillances des LT CD8 innés observées au diagnostic de la phase chronique de la LMC ?

Dans le **Manuscrit 1**, nous avons mis en évidence une altération numérique et fonctionnelle des LT CD8 innés chez les patients LMC-PC au diagnostic.

- Leur défaillance est-elle en lien avec le statut des iNKT ?

L'expression de la protéine BCR-ABL au sein des DC entraîne, comme nous l'avons précédemment évoqué, un défaut d'expression de la molécule CD1d responsable d'une dysfonction des iNKT comprenant une perte d'expression de PLZF et de sécrétion d'IL-4 chez les patients LMC-PC. En 2015, nous avons rapporté dans le sang de cordon placentaire une corrélation entre la fréquence des LT CD8 innés et celle des LT exprimant PLZF (Jacomet et al., 2015). Dans le **Manuscrit 1**, nous avons aussi observé, en regroupant les données des donneurs sains, des patients LMC-PC, et des patients en RCyC sous imatinib, une corrélation entre l'expression de PLZF par les iNKT et l'expression d'Eomes par les LT CD8 innés suggérant à nouveau une possible connexion entre les deux contingents cellulaires chez l'Homme, à l'instar de chez la Souris. Fait notable, une telle association n'a pu être établie à partir de la cohorte de patients en succès d'arrêt de leur ITK depuis au moins 2 ans (**Manuscrit 2**), suggérant que la reprogrammation au sein du compartiment LT CD8 en faveur des LT CD8 innés chez les patients en arrêt de traitement pourrait mettre en jeu un mécanisme indépendant des iNKT et/ou de l'IL-4. Compte tenu du faible effectif étudié dans le cadre de cette cohorte, de la variabilité interindividuelle de fréquence des iNKT, d'autres études sont à réaliser pour éprouver l'existence d'un lien entre les iNKT et les LT CD8 innés chez l'Homme, ainsi que le fait qu'il repose (ou non) sur la production d'IL-4.

- Leur défaillance est-elle en lien avec un défaut de signalisation médiée par l'IL-15 ?

Nous pouvons émettre l'hypothèse que les DC « transformées » (exprimant la protéine BCR-ABL) présentent une altération de leur capacité d'expression de l'IL-15 et/ou de transpräsentation de cette dernière. Il peut aussi être évoqué une perte/altération de la sensibilité à l'IL-15 des LT CD8 innés. Ces questions méritent d'être explorées expérimentalement. Des travaux préliminaires réalisés dans notre laboratoire, montrent que le marqueur CD122, qui correspond à la chaîne β du récepteur de l'IL-15, est fortement exprimé par les LT CD8 innés comparativement aux LT mémoires conventionnels (LT CD8 Eomes⁺ KIR/NKG2A⁻). Nous proposons de réaliser une analyse comparative de l'expression de CD122, ainsi que de la réponse à une stimulation par l'IL-15 des LT CD8 innés chez les patients au diagnostic de LMC-PC *versus* en situation de MMR sous ITK ou en succès d'arrêt de leur ITK.

- Les effecteurs du SI inné jouent-ils un rôle majeur dans l'immunosurveillance de la LMC ?

Au diagnostic de la LMC, il existe un état d'immunosubversion touchant les cellules NK, les iNKT et les LT CD8 innés. Contrairement aux DC, ces populations cellulaires ne font pas parties du clone malin. Leur dysfonctionnement suggère donc que les effecteurs du SI inné exercent un rôle majeur dans l'immunosurveillance de la maladie et que leur altération fait suite au phénomène d'« *immunoediting* » tumoral. A cet égard, la LMC fait figure de pathologie cancéreuse singulière notamment concernant l'implication des cellules NK, les déficits quantitatifs et fonctionnels décrits s'aggravant avec la progression de la maladie vers les phases avancées (Pierson and Miller, 1996). Se pose naturellement la question d'une défaillance globale des LT du gradient « *innateness* » au diagnostic de la maladie, le statut des LT- $\gamma\delta$ et des MAIT méritant aussi d'être étudié.

Les propriétés fonctionnelles *NK-like* des LT CD8 innés sont sévèrement altérées chez les patients au diagnostic de la LMC-PC. Leur capacité de reconnaissance par leur TCR, dans le contexte des molécules du CMH de classe I, de peptides leucémiques tels que PR3, la

télomérase ou WT1, qui sont à l'origine des antigènes du soi, reste cependant à évaluer au diagnostic. Nous disposons de tétramères présentant ces peptides *via* la molécule HLA-A2. Le statut HLA-A2 ayant été testé sur un échantillon de patients LMC-PC, nous sommes en mesure grâce à la technique de CMF de tester la capacité de reconnaissance de ces peptides par les LT CD8 innés au diagnostic et de tester une expansion potentielle du pool de cellules tétramères positives après mise en route du traitement par ITK (cf. chapitre 1.4.2 ci-après).

I.1.2. Quels sont les mécanismes sous-jacents à la restauration numérique et fonctionnelle des LT CD8 innés en situation de rémission sous ITK ?

Chez les patients en RCyC sous imatinib, nous avons observé une restauration numérique complète et, fonctionnelle partielle en termes de sécrétion d'IFN- γ en réponse à une stimulation de type innée, des LT CD8 innés (**Manuscrit 1**). Cette correction pourrait être la conséquence, d'une part de l'effet antitumoral direct des ITK, et d'autre part d'un effet immunomodulateur des ITK. Le traitement de la LMC est uniquement basé sur une thérapie ciblée, faisant à ce titre de la LMC une quasi-exception en matière de pathologie cancéreuse. En termes de thérapie ciblée, les ITK ont de plus un statut singulier du fait qu'ils sont dotés de propriétés immunomodulatrices.

La mise en route du traitement par ITK entraîne l'apoptose des cellules leucémiques BCR-ABL⁺. Nous émettons donc l'hypothèse que la restauration du compartiment des DC entraîne une restauration fonctionnelle des cellules iNKT, laquelle est, à son tour, responsable de celle des LT CD8 innés (**Manuscrit 3**). Chez les patients en rémission sous imatinib (RCyC, MMR et DMR), nous avons en effet rapporté une restauration complète de la sécrétion d'IL-4 par les iNKT (Rossignol et al., 2012b). Une restauration de l'expression de l'IL-15 et/ ou de la sensibilité à l'IL-15 des LT CD8 innés chez les patients en rémission sous ITK, n'a en revanche pas été encore éprouvée.

En dehors de leur effet antitumoral direct, les propriétés immunomodulatrices des ITK peuvent clairement influencer le statut des effecteurs du SI ; on parle alors d'effets « *off-target* » immunologiques. Il a été montré *ex vivo* que les ITK pouvaient « booster » la réponse anti-leucémique en valorisant les fonctions de certains effecteurs et/ou en contrecarrant l'action des cellules immunosuppressives. Ainsi, plusieurs travaux de la littérature, mettent en évidence des effets immunostimulants visant les DC plasmacytoïdes (Mohty et al., 2004), les DC myéloïdes (Boissel N et al., 2004), les CTL (Chen Ci et al., 2008), les LT CD8 spécifiques de LAA (Hughes A et al., 2017), ainsi que des effets répresseurs vis-à-vis des cellules immunosuppressives (contraction du pool des MCSC et des LTreg) (Hughes A et al., 2017).

Parmi les ITK, le dasatinib a des propriétés immunologiques « *off-target* » singulières ; il agit en effet sur les Tec kinases mises en jeu dans la signalisation en aval du TCR, telles que notamment Itk et Rlk. Sous dasatinib, 20 à 30% des patients présentent une lymphocytose modérée qui correspond à une expansion clonale/oligoclonale de CTL et de cellules NK. Le fait que le dasatinib bloque la signalisation des kinases Itk et Rlk, conduit logiquement à émettre l'hypothèse qu'il s'agit, par analogie avec les données acquises chez la Souris, d'une expansion de LT CD8 innés. De ce fait, le caractère immunostimulant du dasatinib pourrait être en partie lié à une reprogrammation du SI en faveur de la différenciation de LT CD8 innés au sein du compartiment LT CD8.

I.1.3. Comment mettre en évidence le rôle joué par les LT CD8 innés dans le contrôle de la LMC ?

I.1.3.1. Leur restauration a-t-elle un caractère prédictif sur la qualité de la réponse obtenue sous traitement ?

Démontrer leur implication dans le contrôle de la maladie est complexe au cours du traitement par ITK car il est difficile de faire la part des choses entre l'effet de l'ITK et celui de la réponse effectrice mise en jeu par le système immunitaire. Jusqu'à présent, une limite importante des études immunologiques réalisées dans la LMC, est qu'il ne s'agit pas d'une

même cohorte de patients analysée de manière longitudinale au cours des différentes phases de la maladie (diagnostic, MMR, DMR, arrêt du traitement) mais de groupes de patients différents.

Pour apporter des éléments de réponse sur le lien entre le statut de la restauration immunitaire des LT CD8 innés et la qualité de la réponse au traitement de la LMC, nous avons mis en place un projet translationnel adossé à un essai clinique national nommé DASA-PegIFN (CHU Poitiers, NCT01872442). Il s'agit d'un essai de phase II incluant des patients nouvellement diagnostiqués LMC-PC qui reçoivent pendant trois mois un traitement par dasatinib en première ligne (ITK ayant une autorisation de mise sur le marché dans cette indication mais non remboursé en France en première ligne), les patients recevant ensuite pendant un an la combinaison dasatinib et IFN- α pégylé (PegIFN). L'objectif de cette association thérapeutique est d'obtenir une proportion très importante de patients obtenant une DMR et ce de manière précoce. Le critère principal de jugement de cet essai correspond à l'incidence cumulée de MR4.5, 12 mois après l'initiation du traitement (M12). Nous avons émis l'hypothèse que la restauration du contingent LT CD8 innés serait un marqueur prédictif de l'obtention d'une DMR précoce et stable. Nous avons collecté, après signature du consentement, les échantillons sanguins des patients au diagnostic, puis à M3, M6, M12, et M24 de l'initiation du traitement.

En premier lieu, à partir de la cohorte constituée (tableau des caractéristiques des patients en **Annexe 4**), nous avons confirmé le défaut numérique des LT CD8 innés (« *innate CD8 T-cells* ») au diagnostic comparativement à une cohorte de DS (cf. **Figure 19A**) ainsi que leur défaillance fonctionnelle attestée par leur défaut d'expression d'Eomes et de CD49d.

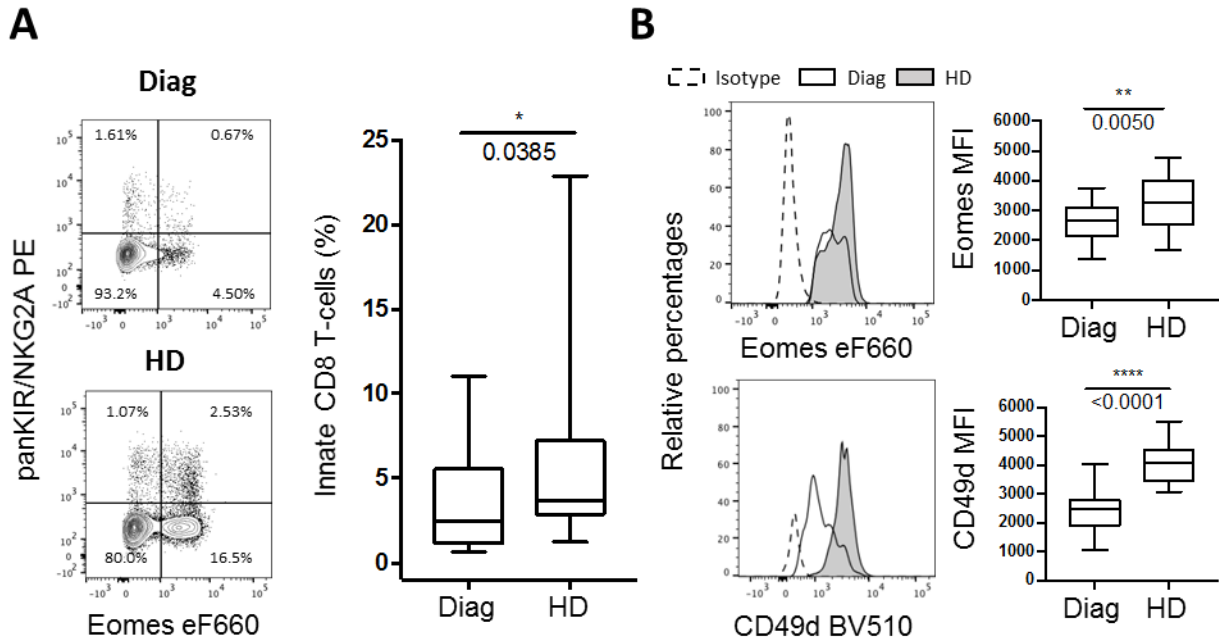


Figure 19 : Altération numérique et fonctionnelle (signature Eomes et CD49d) des LT CD8 innés chez les patients au diagnostic de la LMC-PC.

A. Analyse en cytométrie en flux de la fréquence des LT CD8 innés (Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺) chez les patients LMC prélevés au diagnostic (Diag, n=38) ou chez les donneurs sains (HD (pour *healthy donor*, n=21) au sein des LT CD8⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺. **B.** MFI d'Eomes (Diag, n=36 ; HD, n=21) et de CD49d (Diag, n=32 ; HD, n=20) des LT CD8 innés chez les patients LMC prélevés au diagnostic ou chez les HD. Analyses statistiques : test de Mann Whitney.

Nous avons mis en évidence une restauration numérique maximale du contingent LT CD8 inné dès M3 de traitement (cf. **Figure 20A**). De manière remarquable, cette restauration quantitative se maintient au cours des 24 mois de suivi sous traitement. Sur le plan fonctionnel, les expressions d'Eomes et de CD49d évaluées en MFI (pour *mean fluorescence intensity*) sont augmentées de manière très significative à M3 comparativement au diagnostic. Ces données révèlent un pouvoir d'immunostimulation très rapide porté par le dasatinib.

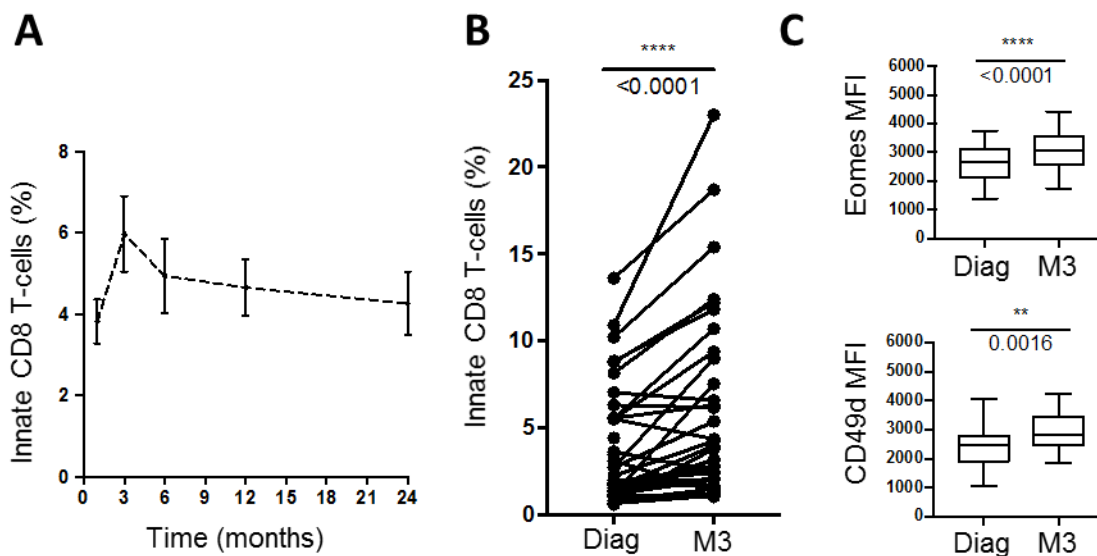


Figure 20 : Restauration numérique et fonctionnelle des LT CD8 innés dès le 3^{ème} mois de traitement.

A. Cinétique de la fréquence des LT CD8 innés au cours des 24 premiers mois de traitement (Diag, n=38 ; M3, n=34 ; M6, n=34 ; M12, n=33 ; M24, n=31), les données sont représentées sous forme d'une courbe de la moyenne \pm SEM (pour *standard error of the mean*). **B.** Analyse de la fréquence des LT CD8 innés (CD8⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺) au diagnostic (Diag, n=38) et après 3 mois de traitement (M3, n=34). **C.** Analyse de la MFI d'Eomes (Diag n=36 ; M3, n=32) et de celle de CD49d (Diag, n=32 ; M3, n=29) des LT CD8 innés au diagnostic et à M3. Analyses statistiques : test de Mann-Whitney (panel A) et test de Wilcoxon (panel B et C).

Afin de rechercher une association entre le statut des LT CD8 innés et la qualité de la réponse au traitement, nous avons divisé les patients en deux groupes, ceux obtenant une DMR précoce à M12 (M12-DMR) *versus* absence de DMR à M12 (M12-noDMR). De manière intéressante, nos résultats montrent une fréquence significativement supérieure (quasi d'un facteur 3) de LT CD8 innés à M3 chez les patients M12-DMR (cf. **Figure 21A**). Il n'y en revanche pas de différence concernant les expressions d'Eomes ou de CD49d (cf. **Figure 21B**). Notons, de plus, que la fréquence élevée de LT CD8 innés présentée par les patients M12-DMR se maintient durant les 24 mois de suivi sous traitement (cf. **Figure 21C**).

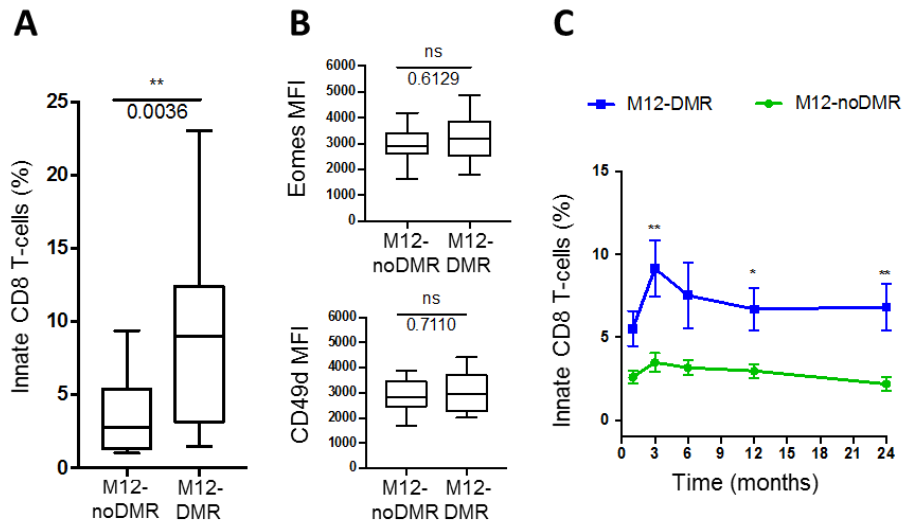


Figure 21 : L'obtention d'une réponse moléculaire profonde (DMR) après 12 mois de traitement (M12) est associée à une fréquence élevée de LT CD8 innés à M3.

A. Analyse de la fréquence des LT CD8 innés après 3 mois de traitement par le dasatinib (M3) chez les patients en DMR à M12 du traitement (M12-DMR, n=15) ou non (M12-noDMR, n=12). **B.** Analyse des MFI d'Eomes (M12-noDMR, n=18 ; M12-DMR, n=14) et de CD49d (M12-noDMR, n=17 ; M12-DMR, n=12) à M3 du traitement par dasatinib chez les patients M12-DMR *versus* M12-noDMR. **C.** Cinétique de la fréquence des LT CD8 innés chez les patients M12-DMR (bleu) *versus* M12-noDMR (vert) au cours des 24 mois de suivi sous traitement (Diag : M12-noDMR, n=22 ; M12-DMR, n=16 ; M3 : M12-noDMR, n=19 ; M12-DMR, n=15 ; M6 : M12-noDMR, n=20 ; M12-DMR, n=14 ; M12 : M12-noDMR, n=18 ; M12-DMR, n=15 ; M24 : M12-noDMR, n=17 ; M12-DMR, n=14) ; les données sont représentées sous forme d'une courbe de la moyenne \pm SEM. Analyses statistiques : test de Wilcoxon (Panel A) ; test de Mann-Whitney (Panel B et C).

Enfin, de manière remarquable, les patients possédant un taux élevé de LT CD8 innés à M3 (« *cut-off* » de fréquence à 6,43% au sein des LT CD8 totaux) ont une probabilité significativement accrue d'obtenir une DMR au cours des 24 premiers de traitement (cf. **Figure 22A**).

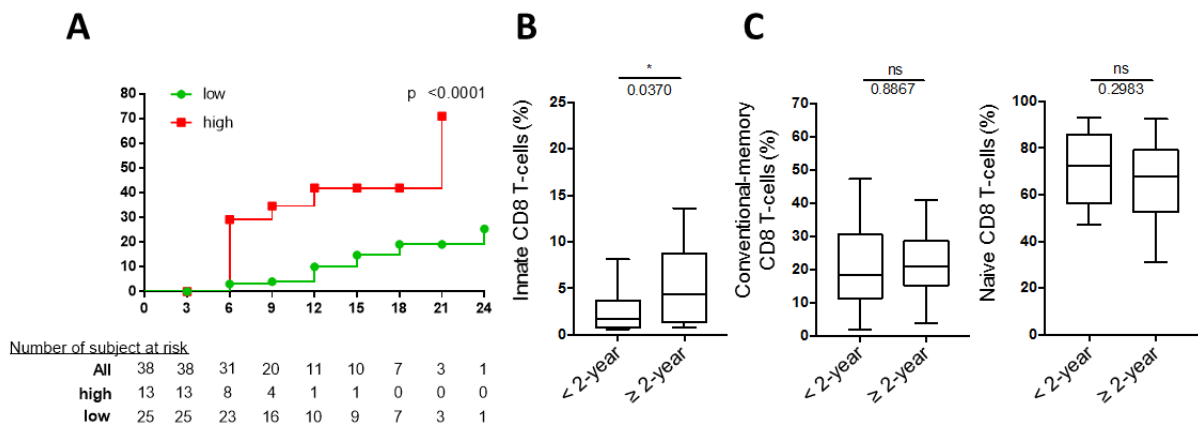


Figure 22 : Une fréquence élevée de LT CD8 innés à M3 est associée à une probabilité supérieure d'obtenir une DMR précoce et durable.

A. Incidence cumulée de DMR au cours des 24 premiers mois de suivi chez les patients avec une proportion faible (vert) versus élevée (rouge) de LT CD8 innés à M3. Le « *cut-off* » de fréquence des LT CD8 innés (6,43%) a été calculé à l'aide de l'index de Youden ; les données sont présentées sous la forme de courbe de Kaplan Meier. **B.** Analyse de la fréquence des LT CD8 innés à M3 chez les patients obtenant ou non une DMR stable pendant au moins 2 ans (< 2-year DMR, n=16 ; ≥ 2-year DMR, n=18). **C.** Analyse de la fréquence à M3 des LT mémoires conventionnels (panel de gauche) et des LT naïfs (panel de droite) chez les patients obtenant ou non une DMR stable pendant au moins 2 ans (< 2-year DMR, n=16 ; ≥ 2-year DMR, n=18). Analyses statistiques : Test Mantel-cox (Panel A) et test de Mann-Whitney (Panel B et C).

La stabilité de la DMR (minimum de 2 ans pour les critères français) est un prérequis nécessaire pour une tentative d'arrêt du traitement par ITK. Nos résultats montrent que les patients conservant leur DMR sur une durée ≥ 2 ans ont une fréquence significativement accrue de LT CD8 innés à M3 (cf. **Figure 22B**). Une telle relation n'est pas retrouvée lorsque l'on considère les compartiments T CD8 mémoire conventionnel et T naïf (cf. **Figure 22C**).

L'ensemble de ces données suggèrent une association forte entre restauration numérique et fonctionnelle des LT CD8 innés et l'obtention d'une réponse au traitement à la fois précoce et profonde (obtention d'une DMR à M12). De manière originale, nos résultats plaident en faveur d'une participation des LT CD8 innés dans le contrôle de la LMC en amont de l'obtention d'une réduction importante de la « masse tumorale », compte tenu de l'impact de la restauration obtenue dès M3 de traitement sur la qualité de la réponse au traitement. Ce concept est précurseur car la restauration du système immunitaire a été décrite, notamment par Hughes *et al.*, comme optimale après l'obtention d'une MR4.5 soit dans une situation de maladie résiduelle très significativement réduite (Hughes A et al., 2017). Il faut souligner qu'il s'agit d'une des premières études permettant d'établir une corrélation entre un facteur biologique immunologique et l'obtention d'une DMR au sein d'une cohorte suivie de manière longitudinale et traitée de manière « homogène » puisque les résultats présentés concernent des patients ayant été traités par la combinaison dasatinib et PegIFN.

Nous souhaitons conduire à l'avenir une étude prospective, multicentrique, dans la LMC-PC, pour démontrer l'association entre restauration numérique et qualitative précoce (dès le 3^{ème} mois de traitement) des LT CD8 innés (**signature sanguine d'immuno-restauration des**

LT CD8 innés) et l'obtention d'une DMR au cours des trois premières années de traitement par les ITK disponibles en première ligne en France (imatinib, nilotinib, bosutinib). La mise en place de cette cohorte monitorée dès le diagnostic nous permettra de tester également le caractère prédictif de cette signature sanguine d'immuno-restauration des LT CD8 innés sur le succès d'arrêt du traitement par ITK.

1.1.3.2. Les LT CD8 innés : un biomarqueur prédictif du succès d'arrêt des ITK dans la LMC ?

L'arrêt du traitement par ITK offre dans le cadre de la LMC l'opportunité d'observer l'effet net du système immunitaire sur le clone leucémique résiduel. Nous avons mis en évidence une supériorité numérique très significative des LT CD8 innés chez les patients en succès prolongé d'arrêt du traitement par ITK (\geq deux ans) comparativement à une cohorte de patients en MMR sous ITK, leurs propriétés fonctionnelles *innate-like* étant restaurées de manière complète (**Manuscrit 2**).

Ce résultat nous conduits à émettre l'hypothèse que le contingent LT CD8 inné pourrait représenter un biomarqueur cellulaire prédictif du succès de l'arrêt des ITK dans la LMC. Nous avons donc mis en place une étude prospective permettant un immunomonitoring des LT CD8 innés au cours de l'arrêt du traitement dans la LMC. Ce protocole de recherche non interventionnelle impliquant la personne humaine de catégorie 3 (promoteur CHU de Poitiers) soutenue par le groupe d'experts français Fi-LMC correspond à la mise en place d'une biocollection à l'échelle nationale avec des prélèvements sanguins réalisés : le jour de l'arrêt (T0), puis à 3 mois d'arrêt (M3), M6, M12, M24, puis 1 fois par an (suivi maximal de 5 ans) et, en cas de rechute, avant la reprise du traitement par ITK.

Nos données préliminaires montrent que les patients en succès d'arrêt à M12 (« *no relapsing* ») ont une fréquence de LT CD8 innés au moment de l'arrêt (T0) significativement supérieure à celle des patients qui ont présenté une récurrence moléculaire (perte de la MMR)

et repris le traitement au cours de la même période (« *relapsing* ») (cf. **Figure 23a**). De manière intéressante, nos résultats montrent également une fréquence accrue de LT CD8 innés exprimant la perforine (cellules T CD8 Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ Perforine⁺) (cf. **Figure 23b**) et réduite de LT CD8 innés exprimant le marqueur d'exhaustion PD-1 (cellules T CD8 Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ PD-1⁺) (cf. **Figure 23c**). Ces données suggèrent que les LT CD8 innés participent au contrôle de la maladie après arrêt du traitement par ITK et qu'ils constituent une signature prédictive du succès d'arrêt de traitement dans la LMC tant sur le plan numérique que qualitatif.

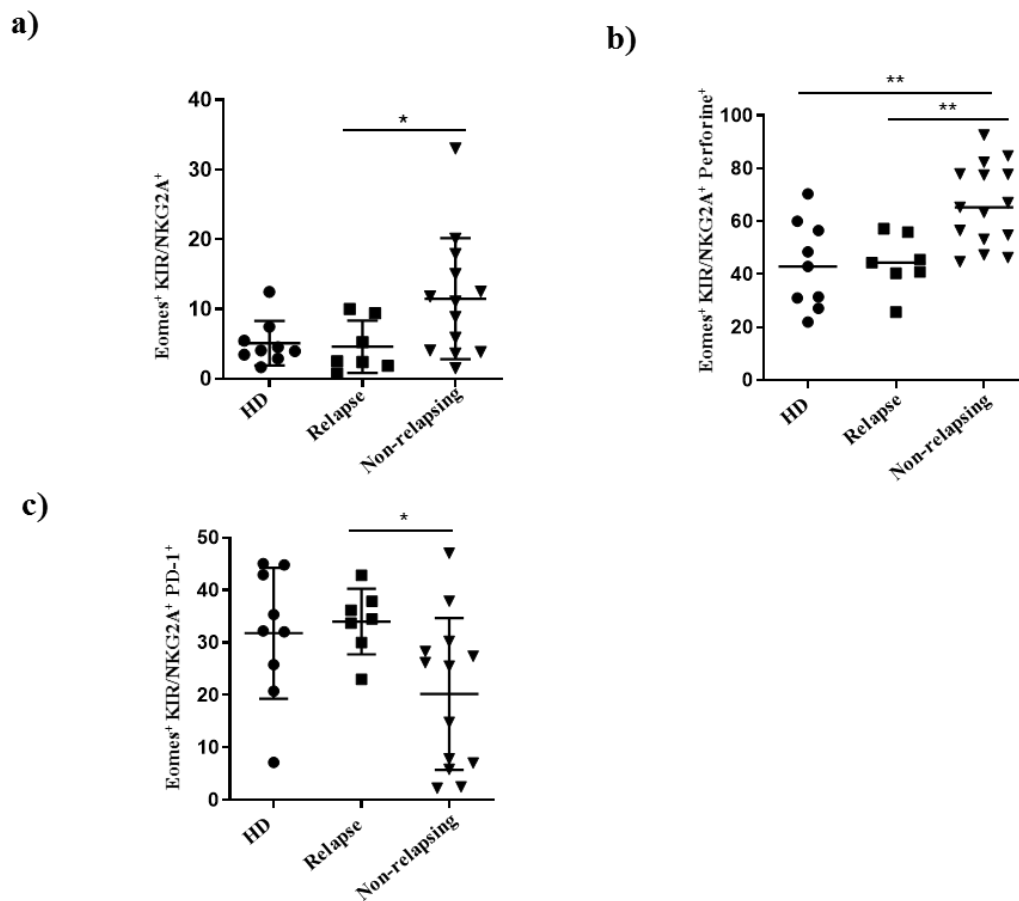


Figure 23 : Analyse quantitative et fonctionnelle des LT CD8 innés (Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺) dans la cohorte prospective d'arrêt de traitement (n=20).

a) Proportion des LT CD8 innés au sein des LT CD8 totaux, **b)** Proportion de LT CD8 innés exprimant la perforine, **c)** Proportion de cellules T CD8 innés exprimant PD-1. Chaque symbole représente un sujet sain ou un patient. Résultats exprimés en pourcentage avec représentation de la médiane. Analyse statistique : test de Mann-Whitney. *HD* (pour *healthy donor*) : donneurs sains (n=9), « *relapse* » : patients présentant une récurrence moléculaire et reprenant le traitement au cours des 6 premiers

mois d'arrêt du traitement (n=7), « *non-relapsing* » : patients en rémission sans traitement au-delà de 12 mois d'arrêt (n=13).

Comme nous l'avons développé dans notre introduction générale, les critères d'éligibilité actuels à l'arrêt du traitement dans la LMC reposent uniquement sur la durée de traitement par ITK et celle de la DMR. Sur cette base, la probabilité de succès d'arrêt à M12 est d'environ 50%. A l'heure actuelle, à l'échelle internationale, aucune recommandation n'intègre le statut du système immunitaire du patient dans ses critères d'éligibilité à l'arrêt du traitement par ITK. Or, les données de la littérature suggèrent que le succès d'arrêt des ITK est déterminé par non seulement par l'efficacité de la réduction de la « masse tumorale » attestée par l'obtention d'une DMR stable mais également par la capacité du patient à obtenir la restauration d'un état d'immunosurveillance. Ce dernier comprend deux volets non exclusifs entre eux : d'une part une restauration des effecteurs de la réponse anti-leucémique, et d'autre part la suppression des mécanismes d'immunosubversion. Dans la littérature, les populations cellulaires pour lesquelles un lien avec les résultats de TFR a pu être établi sont : **i)** les cellules NK pour le versant effecteur ; **ii)** les LTreg, les DC plasmacytoïdes, et les MDSC pour le versant immunosuppresseur. L'équipe d'Agnès Hong et de Timothy Hughes a récemment généré un modèle mathématique visant à prédire les résultats de TFR en y intégrant dans leur modèle le nombre absolu de cellules NK, de MDSC myéloïdes et de LTreg, déterminé au moment de l'arrêt (T0) (Irani et al., 2020).

Le compartiment T CD8 inné est jusqu'à présent le seul contingent T CD8 pour lequel un lien avec la probabilité de récurrence moléculaire a pu être mis en évidence. La poursuite du suivi de la cohorte constituée dans le cadre de notre projet d'essai clinique précédemment évoqué, nous permettra d'évaluer si la prise en compte de la signature sanguine d'immuno-restauration des LT CD8 innés à M3 est prédictive du succès d'arrêt des ITK et s'il est pertinent de l'intégrer dans les critères d'éligibilité à l'arrêt des ITK. Avoir la capacité d'évaluer plus finement les chances de succès d'arrêt du traitement par ITK représente un vrai défi ; disposer,

de plus, d'un marqueur biologique précoce au cours de la prise en charge (M3) est novateur. Nous étudierons en parallèle la possibilité d'enrichir cette signature par d'autres effecteurs antitumoraux du système immunitaire inné : cellules NK et LT du gradient « *innateness* » (iNKT, MAIT et LT- $\gamma\delta$) (Gutierrez-Arcelus M et al., 2019).

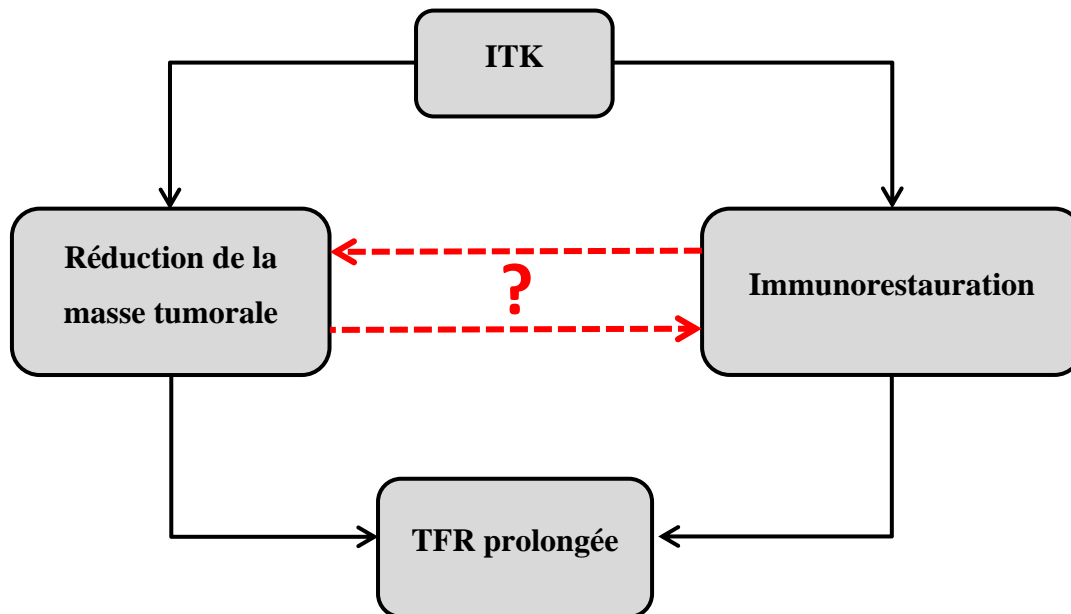


Figure 24 : La réduction de la masse tumorale (obtention d'une DMR stable) et la restauration d'un état d'immunosurveillance sont les deux piliers d'une TFR prolongée.

La restauration du système immunitaire a été décrite comme optimale chez les patients en DMR. Nous postulons que le système immunitaire, et plus précisément le contingent LT CD8 inné, peut également impacter la qualité de la réponse obtenue sous ITK.

Les données de la maladie résiduelle (type de DMR, durée de la DMR) et du statut d'immuno-restauration (signature sanguine d'immunorestauration des LT CD8 innés), pourrait *in fine* aboutir à :

i) proposer pour certains patients un arrêt plus précoce des ITK par rapport aux recommandations actuelles, avec pour conséquence une réduction des effets indésirables et une amélioration de la qualité de vie pour le patient et, une réduction des coûts pour la société,

ii) proposer des stratégies alternatives aux patients pour lesquels les conditions d'un potentiel succès d'arrêt ne sont pas réunies (stratégies d'immuno-interventions, stratégie de maintenance avec dé-escalade de dose des ITK).

I.1.4. Quelles sont nos perspectives pour approfondir dans la LMC la caractérisation des LT CD8 innés ?

I.1.4.1. *Les LT CD8 innés sont-ils capables de cytotoxicité naturelle ou dépendante de leur TCR vis-à-vis de cellules tumorales ?*

Nous souhaitons mettre en évidence de manière expérimentale les capacités de cytotoxicité directe des LT CD8 innés vis-à-vis de cellules cancéreuses. Grâce au modèle de la LMC, nous souhaitons tester leur capacité cytolytique :

- de manière non dépendante du TCR en les confrontant aux cellules de la lignée K562 qui n'expriment pas les molécules de classe I du CMH et qui sont une cible naturelle des cellules NK,
- dans un système pouvant engager une reconnaissance *via* leur TCR en les confrontant à des cellules CD34⁺ BCR-ABL⁺ autologues prélevés au diagnostic. Grâce à notre banking de PBMC réalisés au diagnostic, en situation de MMR sous ITK et enfin au cours de l'arrêt de traitement, nous pourrions tester l'évolution de leur potentiel cytotoxique en fonction des phases de la maladie.

I.1.4.2. *Existence d'une expansion clonale ou oligoclonale des LT CD8 innés chez les patients LMC?*

Comme évoqué dans le chapitre précédent 1.1, nous testerons la capacité de reconnaissance de certains peptides leucémiques par les LT CD8 innés et ainsi leur participation à la réponse immunitaire adaptative anti-LMC. Une telle reconnaissance est susceptible d'être fortement amplifiée par la mort massive des cellules leucémiques induite par la mise en œuvre du traitement par ITK.

L'expansion des LT CD8 innés mise en évidence à M3 dans l'étude Dasa-PegIFN peut évoquer un profil clonal ou oligoclonal. Nous utiliserons en premier lieu la technique de CMF pour analyser le répertoire V α et V β . Les données recueillies nous permettront de guider notre analyse en immunoscope en enrichissant le milieu avec les TCR-V α , V β les plus utilisés (pour revue et protocole (Pannetier C et al., 1995) ou encore par la technologie "single cell-RNA seq". Nous analyserons les patients au diagnostic de LMC-PC *versus* à trois mois de traitement par

ITK en première ligne ainsi qu'au cours de l'arrêt de traitement par ITK en comparant les données à T0 des patients en TFR à M12 *versus* échec et reprise du traitement ^par ITK.

1.1.4.3. Les LT CD8 innés peuvent-ils être valorisés par une immunothérapie ciblant la voie PD-1/PD-L1 ?

Nous avons observé un défaut numérique et fonctionnel des LT CD8 innés lors de la LMC au diagnostic et un possible lien entre son niveau d'expression de PD-1 et la réussite d'arrêt de traitement (cf **Figure 23c**). De plus, de nombreuses études ont abordé le rôle d'Eomes dans l'exhaustion des LT CD8 au cours des infections chroniques ou des cancers. Par exemple, une équipe américaine a récemment montré chez la Souris que les LT CD8 spécifiques des antigènes viraux, en état d'exhaustion en phase chronique de l'infection par le virus LCMV attesté par leur expression augmentée de PD-1 et, restaurés après traitement par un anticorps anti-PD-1, exprimaient fortement Eomes et présentaient des caractéristiques de LT CD8 mémoires (Im Sj et al., 2016).

Nous proposons de tester l'hypothèse que le statut inné des LT CD8 innés peut être modulé par les interactions PD-1/PD-L1. Dans ce but, nous pourrions réaliser des expériences de co-culture *in vitro* de CMN totales ou enrichies en LT CD8 par tri magnétique, de sujets normaux et de patients « *relapsing* » avec une lignée cellulaire exprimant PDL-1 (« CHO *recombinant cell line* ») avec stimulation par la combinaison IL-12+IL-18 en présence d'IL-15 et ajout (ou non) d'un anticorps bloquant anti-PD-1 (clone 5C4.B8, Nivolumab) avec une lecture à 48 heures des cellules productrices l'IFN- γ par CMF. Nous postulons que dans les conditions de stimulation par l'anti-PD-1, nous observerions une amplification de la population de LT CD8 innée productrice d'IFN- γ .

1.1.4.4. Existence d'une signature métabolique singulière des LT CD8 innés ?

Selon certaines études, tant chez l'Homme que chez la Souris, les capacités de survie et fonctionnelles des LT CD8 sont fortement en lien avec leur signature métabolique (Almeida L

et al., 2016; van der Windt GJ and Pearce EJ, 2012). Ainsi, les LT naïfs utilisent de manière prédominante le mécanisme de phosphorylation oxydative. Les LT effecteurs possèdent un programme transcriptionnel pour amplifier leur capacité de glycolyse aérobie après stimulation de leur TCR tandis que les LT mémoires conventionnels utilisent à l'état basal la phosphorylation oxydative mais sont caractérisés par une réserve énergétique mitochondriale élevée. On parle de capacité de réserve respiratoire qui se définit par la différence de consommation d'oxygène entre l'état basal et leur capacité maximale. Une capacité de réserve respiratoire élevée a été proposée comme un élément déterminant d'une part, du potentiel fonctionnel des LT, compte tenu du fait qu'après une seconde rencontre de l'antigène les LT mémoires ont une capacité de réponse rapide et, d'autre part de la capacité de survie accrue des LT mémoires.

L'équipe de Quinn *et al.* a récemment recherché si les LT CD8 VM avaient une signature métabolique particulière comparativement aux LT CD8 mémoires conventionnels et aux LT naïfs chez la Souris et chez l'Homme (Quinn KM et al., 2020). Leurs résultats montrent que le contingent des LT CD8 VM est caractérisé une capacité de réserve respiratoire élevée, cette dernière augmentant avec l'âge. De manière intéressante, leurs données suggèrent que cette élévation de la capacité de réserve respiratoire est liée aux taux physiologiques d'IL-15 avec une augmentation de la sensibilité à l'IL-15 avec l'âge expliquant leur accumulation en périphérie ; cette élévation de la capacité de réserve respiratoire ne reflète finalement pas leur potentiel fonctionnel. Contrairement aux données antérieures de la littérature, les auteurs concluent qu'une capacité de réserve respiratoire élevée n'est une signature, ni des LT CD8 mémoires conventionnels, ni des capacités fonctionnelles des LT CD8. Ces résultats rejoignent le concept développé en Introduction Générale selon lequel les LT CD8 IM/VM correspondent à un mécanisme physiologique de reprogrammation du SI pour assurer l'immunité anti-infectieuse dans les situations de relative défaillance du SI adaptatif que représentent les âges

extrêmes de la vie. En définitive, cette reprogrammation du SI pourrait aussi concerner l'immunovigilance antitumorale ; les données de Miller *et al.* obtenues récemment chez la Souris et celles que nous avons acquises chez l'Homme dans la LMC, notamment chez les patients en succès prolongé d'arrêt de leur ITK, corrobore cette hypothèse.

Nous avons pour objectif de déterminer si les LT CD8 innés ont une signature métabolique particulière pouvant servir de marqueur prédictif d'arrêt de traitement sans rechute dans la LMC. Le métabolisme des LT CD8 innés pourrait être évalué par CMF chez les patients en arrêt de traitement (M0, M3, M6) dans notre étude pilote prospective en opposant les deux bras « no relapse-M12 » et « *relapsing* ». En parallèle, une cohorte de donneurs sains sera également suivie. Les paramètres suivants seraient mesurés : l'entrée du glucose (sonde 2-NBDG), la masse mitochondriale (sonde Mitotracker®), l'entrée des acides gras dans les cellules (utilisation de sondes BODIPY®), le niveau d'expression du récepteur aux acides gras CD36 et celui du facteur de transcription régulateur de la biogénèse mitochondriale PGC-1 α . Les LT CD8 innés ayant des caractéristiques communes avec les LT CD8 mémoires conventionnels, à l'état normal, nous présumons que leur masse mitochondriale sera conservée, mais que le rapport entre glycolyse et β -oxydation des acides gras pourra être affecté au vu de leurs caractéristiques fonctionnelles différentes de celles des LT CD8 mémoires conventionnels (i.e., contenu cytotoxique et réponse aux cytokines pro-inflammatoires plus élevés).

Martinet *et al.* ont publié en octobre 2020 un travail suggérant le rôle du corécepteur activateur des CTL : CD226. La perte de CD226 est associée à un dysfonctionnement des LT CD8 (altération de l'activation du programme « effecteur » en aval du TCR) dans le sang périphérique chez le sujet sain, tandis qu'ils ont mis en évidence une accumulation de LT CD226^{neg} dans différentes pathologies cancéreuses chez l'Homme et la Souris. Le mécanisme de perte de CD226 impliquerait Eomes après reconnaissance antigénique (Weulersse M et al., 2020). Ainsi, en situation chronique de LMC, nous rechercherons un éventuel phénotype

d'exhaustion de type TIL : une diminution de la masse mitochondriale associée à une faible expression du facteur de transcription régulateur de la mitogenèse mitochondriale PGC-1 α et à une baisse de l'entrée du glucose dans les cellules. Ces premières analyses *ex vivo* par CMF, nous permettraient de déterminer, quelles voies métaboliques sont préférentiellement utilisées par les LT CD8 innés à l'état normal, en situation chronique de cancer ou après mise en rémission.

I.2. Implication des LT CD8 innés dans l'immunosurveillance d'autres cancers ?

Nos données acquises dans la LMC nous ont conduits à étendre la question de l'implication des LT CD8 innés dans l'immunosurveillance antitumorale en général. A cet égard, nous avons mis en évidence la présence de LT CD8 innés dans deux types de cancers solides : sein et ovaire (**Manuscrit 3**).

Concernant les cancers ovariens, les LT CD8 innés sont présents dans les différents compartiments tumoraux (au sein de la tumeur, de la carcinose péritonéale et l'ascite néoplasique) et il existe une corrélation entre leur fréquence et celle des iNKT. Les données actuelles indiquent que seuls 20 à 25 % des patientes tirent bénéfice des immunothérapies anti-PD-1 et anti-CTLA-4. Nous disposons de données préliminaires montrant que les LT CD8 innés présents dans les différents sites tumoraux ont un phénotype de type Trm (pour *tissue resident memory T-cells*). Les Trm représentent une population de LT mémoires qui ne circulent pas dans l'organisme et qui restent localisés dans les tissus au sein desquels ils participent à l'immunosurveillance locale. Ils sont capables d'induire une réponse rapide et efficace en cas de réintroduction d'un pathogène chez l'Homme et chez la Souris. Ils expriment l'intégrine CD103, le marqueur CD69 et fortement Granzyme B (Morris et al., 2019). Des études menées à partir de pièces opératoires de différents cancers solides ont révélé que le pool de TIL CD8 incluait un contingent de LT CD8 de type Trm. De plus, dans certains cancers solides (mélanome et sein), l'infiltration en Trm dans le microenvironnement tumoral serait

corrélée à une meilleure réponse à une immunothérapie de type anti-PD-1 (Byrne A et al., 2020). Les résultats que nous avons obtenus dans le cancer de l'ovaire montrent que les LT CD8 innés de phénotype Trm expriment à la fois des marqueurs d'activation (CD137) et des marqueurs d'exhaustion, à savoir PD-1 et TIM-3 ; ce profil phénotypique est conciliable avec celui des populations de LT CD8 dont la fonction effectrice est restaurée sous immunothérapie ciblant PD-1/PD-L1 en modélisation chez la Souris et chez l'Homme ((Huang et al., 2017) et pour revue (McLane Lm et al., 2019)). Nous avons ainsi pour objectif dans le cancer de l'ovaire de rechercher si les LT CD8 innés sont directement impliqués dans la réponse dirigée contre la tumeur, d'identifier leur statut TIL et/ou Trm et de déterminer s'ils représentent un biomarqueur prédictif de la réponse aux ICI.

Nous avons également initié une analyse des LT CD8 innés dans la moelle osseuse de patients atteints d'une autre hémopathie maligne : le myélome multiple (MM). Ce dernier est caractérisé par une prolifération clonale de plasmocytes tumoraux, la moelle osseuse représentant l'essentiel du microenvironnement tumoral. Au diagnostic nos résultats préliminaires ne montrent pas de différence en termes de fréquence de LT CD8 innés entre les moelles osseuses de sujets sains et de patients MM. En revanche, il existe une très nette diminution de leur fréquence à la rechute du MM. La très faible expression de CCR7 par les LT CD8 innés au sein du microenvironnement tumoral du MM soulève la question d'un phénotype de type Trm dans ce contexte. Nous nous baserons, comme dans le cancer de l'ovaire, sur l'expression des marqueurs CD69 et CD103.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons identifié chez l'Homme un nouveau contingent de LT innés que nous avons dénommés LT CD8 innés. Son étude chez les patients atteints de LMC nous a apporté des données fondamentales sur sa signification physiologique en révélant son implication en tant qu'effecteur du SI inné dans le contrôle de la LMC. Notre travail suggère, de plus, un mécanisme de reprogrammation du SI en faveur de ce nouveau contingent, à la fois sous ITK et en particulier sous dasatinib, ainsi qu'en situation de rémission sans traitement.

Sur le plan clinique, leur statut de biomarqueur cellulaire prédictif de la qualité de la réponse au traitement et du succès d'arrêt des ITK dans la LMC pourrait impacter la prise en charge des patients en permettant de définir un statut d'immunorestauration. L'évaluation des LT CD8 innés pourrait ainsi être intégrée dans les critères d'éligibilité à l'arrêt du traitement, voire conduire à envisager un arrêt de traitement plus précoce. Pour les patients en échec d'immunorestauration, nos travaux pourraient, à terme, fournir un rationnel pré-clinique pour l'utilisation de stratégies d'immunothérapies telles que les ICI afin de valoriser les fonctions des LT CD8 innés.

Pour asseoir leur qualité d'effecteur antitumoral, nous avons étudié leur statut de TIL et/ou Trm dans d'autres cancers. Nous avons pu établir leur présence dans le microenvironnement tumoral de trois autres cancers : sein, ovaire et myélome multiple. Nos travaux préliminaires suggèrent une reprogrammation des LT CD8 innés en Trm dans le cancer de l'ovaire et nous conduisent à émettre l'hypothèse qu'ils pourraient, à nouveau, représenter un biomarqueur prédictif de la réponse au traitement, les ICI dans ce cas.

En dehors des aspects biologiques et des applications cliniques présentés dans le domaine de l'oncologie, se pose la question du lien entre l'homéostasie des LT CD8 innés et la sénescence du SI. L'étude de leur fréquence, de leur sensibilité à l'IL-15 et de leur profil

métabolique en fonction de l'âge, nous permettra de tester l'hypothèse qu'ils constituent un indicateur potentiel de la reprogrammation physiologique du SI avec l'âge.

BIBLIOGRAPHIE

Akue Ad, Lee Jy, and Jameson Sc (2012). Derivation and maintenance of virtual memory CD8 T cells.

Allison Tj, Winter Cc, Fournié Jj, Bonneville M, and Garboczi Dn (2001). Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor.

Almand, A., Jr, R., B, L., S, N., Ji, C., Ed, K., Dp, C., and Di, G. (2000). Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer.

Almeida L, Lochner M, Berod L, and Sparwasser T (2016). Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation.

Andreotti, A.H., Schwartzberg, P.L., Joseph, R.E., and Berg, L.J. (2010). T-Cell Signaling Regulated by the Tec Family Kinase, Itk. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002287.

Angelosanto Jm, Blackburn Sd, A, C., and Ej, W. (2012). Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection.

Ansell, S.M. (2017). Harnessing the power of the immune system in non-Hodgkin lymphoma: immunomodulators, checkpoint inhibitors, and beyond. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2017*, 618–621.

Arnould L, Gelly M, F, P.-L., L, B., F, B., C, M., V, C., V, F., P, B., J, G., et al. (2006). Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism?

Artis D, and Spits H (2015). The biology of innate lymphoid cells.

Atherly Lo, Lucas Ja, Felices M, Yin Cc, Reiner Sl, and Berg Lj (2006). The Tec family tyrosine kinases Itk and Rlk regulate the development of conventional CD8+ T cells.

Bachy, E., Bernaud, J., Roy, P., Rigal, D., and Nicolini, F.E. (2011). Quantitative and functional analyses of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in chronic phase chronic myeloid leukaemia patients at diagnosis and on imatinib mesylate. *Br. J. Haematol.* 153, 139–143.

Balachandran Vp, Cavnar Mj, Zeng S, Bamboat Zm, Ocuin Lm, Obaid H, Sorenson Ec, Popow R, Ariyan C, Rossi F, et al. (2011). Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido.

Baniyash M (2004). TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response.

Barry Kc, Hsu J, Ml, B., Fj, C., M, B., Aj, C., Ae, N., K, L., R, K., Md, R., et al. (2018). A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments.

Beatty GI, and Gladney WI (2015). Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy.

Berke Z, Andersen Mh, Pedersen M, Fugger L, Zeuthen J, and Haurum Js (2000). Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules.

Berzins, S.P., Smyth, M.J., and Baxter, A.G. (2011). Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 131–142.

Berzins Sp, Ad, C., Dg, P., Mj, S., and Di, G. (2005). Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples.

Bi, J., and Tian, Z. (2019). NK Cell Dysfunction and Checkpoint Immunotherapy. *Front. Immunol.* *10*.

Björkström Nk, Béziat V, Cichocki F, Liu Ll, Levine J, Larsson S, Koup Ra, Anderson Sk, Ljunggren Hg, and Malmberg Kj (2012). CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells.

Bocchia, M., Korontsvit, T., Xu, Q., Mackinnon, S., Yang, S.Y., Sette, A., and Scheinberg, D.A. (1996). Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood* *87*, 3587–3592.

Bocchia, M., Gentili, S., Abruzzese, E., Fanelli, A., Iuliano, F., Tabilio, A., Amabile, M., Forconi, F., Gozzetti, A., Raspadori, D., et al. (2005). Effect of a p210 multi-peptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *The Lancet* *365*, 657–662.

Bocchia, M., Defina, M., Aprile, L., Ippoliti, M., Crupi, R., Rondoni, M., Gozzetti, A., and Lauria, F. (2010). Complete molecular response in CML after p210 BCR–ABL1-derived peptide vaccination. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *7*, 600–603.

Boissel N, Rousselot P, Raffoux E, Cayuela Jm, Maarek O, Charron D, Degos L, Dombret H, Toubert A, and Rea D (2004). Defective blood dendritic cells in chronic myeloid leukemia correlate with high plasmatic VEGF and are not normalized by imatinib mesylate.

Boissel N, Rea D, Tieng V, Dulphy N, Brun M, Cayuela Jm, Rousselot P, Tamouza R, Le Bouteiller P, Mahon Fx, et al. (2006). BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia.

Bonifaz, B., D, B., K, M., M, R., Mc, N., and Rm, S. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance.

Borg, C., Terme, M., Taïeb, J., Ménard, C., Flament, C., Robert, C., Maruyama, K., Wakasugi, H., Angevin, E., Thielemans, K., et al. (2004). Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J. Clin. Invest.* *114*, 379–388.

Bouet-Toussaint F, Cabillic F, Toutirais O, Le Gallo M, Thomas de la Pintièrre C, Daniel P, Genetet N, Meunier B, Dupont-Bierre E, Boudjema K, et al. (2008). Vgamma9Vdelta2 T cell-

mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas.

Bourgeois E, Lp, V., M, S., S, D., A, B., S, R., Jm, G., E, S., M, D., P, G., et al. (2009). The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production.

Boutin, L., and Scotet, E. (2018). Towards Deciphering the Hidden Mechanisms That Contribute to the Antigenic Activation Process of Human V γ 9V δ 2 T Cells. *Front. Immunol.* 9.

Brennan Pj, Rv, T., M, B., Ey, K., A, T., Jp, S., Sd, G., Ff, H., Gs, B., and Mb, B. (2011). Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals.

Broussard C, Fleischacker C, Horai R, Chetana M, Venegas Am, Sharp Ll, Hedrick Sm, Fowlkes Bj, and Schwartzberg Pl (2006). Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk.

Brown, S., Hutchinson, C.V., Aspinall-O'Dea, M., Whetton, A.D., Johnson, S.M., Rees-Unwin, K., and Burthem, J. (2014). Monocyte-derived dendritic cells from chronic myeloid leukaemia have abnormal maturation and cytoskeletal function that is associated with defective localisation and signalling by normal ABL1 protein. *Eur. J. Haematol.* 93, 96–102.

Brück O, Blom S, Dufva O, Turkki R, Chheda H, Ribeiro A, Kovanen P, Aittokallio T, Koskenvesa P, Kallioniemi O, et al. (2018). Immune cell contexture in the bone marrow tumor microenvironment impacts therapy response in CML.

van der Bruggen, P., C, T., P, C., C, L., E, D.P., B, V. den E., A, K., and T, B. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.

Burnet Fm (1970). The concept of immunological surveillance.

Byrne A, Savas P, Sant S, Li R, Virassamy B, Luen Sj, Beavis Pa, Mackay Lk, Neeson Pj, and Loi S (2020). Tissue-resident memory T cells in breast cancer control and immunotherapy responses.

Cerwenka, C., and Lanier, L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer.

Chang Pp, P, B., J, F., A, P., Cs, M., A, K., Jj, H., V, C., Sg, T., R, B., et al. (2011). Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses.

Chauvin C, Joalland N, Perroteau J, Jarry U, Lafrance L, Willem C, Retière C, Oliver L, Gratas C, Gautreau-Rolland L, et al. (2019). NKG2D Controls Natural Reactivity of V γ 9V δ 2 T Lymphocytes against Mesenchymal Glioblastoma Cells.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541, 321–330.

Chen, C.I.-U., Koschmieder, S., Kerstiens, L., Schemionek, M., Altvater, B., Pscherer, S., Gerss, J., Maecker, H.T., Berdel, W.E., Juergens, H., et al. (2012). NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. *Leukemia* 26, 465–474.

Chen Ci, Maecker Ht, and Lee Pp (2008). Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment.

Chen Ds, and Mellman I (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle.

Chien Yh, Meyer C, and Bonneville M (2014). $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond.

Christiansson, L., Söderlund, S., Mangsbo, S., Hjorth-Hansen, H., Höglund, M., Markevörn, B., Richter, J., Stenke, L., Mustjoki, S., Loskog, A., et al. (2015). The tyrosine kinase inhibitors imatinib and dasatinib reduce myeloid suppressor cells and release effector lymphocyte responses. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 1181–1191.

Coley, W.B. (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop.* 3–11.

Cordova A, Toia F, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Rinaldi G, Todaro M, Cicero G, Zichichi L, Donni Pl, et al. (2012). Characterization of human $\gamma\delta$ T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas.

Correia Dv, Fogli M, Hudspeth K, da Silva Mg, Mavilio D, and Silva-Santos B (2011). Differentiation of human peripheral blood V δ 1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells.

Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier Jf, Scotet E, Bonneville M, and Jotereau F (2005). V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells.

Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 135–146.

Della Bella, S., M, G., M, V., C, F., S, N., A, R., M, C., M, G., and Ml, V. (2003). Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer.

Dhanji, S., Chow, M.T., and Teh, H.-S. (2006). Self-Antigen Maintains the Innate Antibacterial Function of Self-Specific CD8 T Cells In Vivo. *J. Immunol.* *177*, 138–146.

Diefenbach A, Jensen Er, Am, J., and Dh, R. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity.

Dieu-Nosjean Mc, Giraldo Na, H, K., C, G., Wh, F., and C, S.-F. (2016). Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers.

Dong, R., Cwynarski, K., Entwistle, A., Marelli-Berg, F., Dazzi, F., Simpson, E., Goldman, J.M., Melo, J.V., Lechler, R.I., Bellantuono, I., et al. (2003). Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* *101*, 3560–3567.

Drobek A, Moudra A, Mueller D, Huranova M, Horkova V, Pribikova M, Ivanek R, Oberle S, Zehn D, McCoy Kd, et al. (2018). Strong homeostatic TCR signals induce formation of self-tolerant virtual memory CD8 T cells.

Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., et al. (2001). Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* *344*, 1031–1037.

Dudek, D., S, M., Ad, G., and P, A. (2013). Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* *3*, 991–998.

Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Péguillet I, Premel V, Louis D, Milder M, Le Bourhis L, C, S., Treiner E, et al. (2011). Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells.

Ehrlich, P. (1909). Ehrlich: Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung - Google Scholar.

El Missiry M, Adnan Awad S, Rajala Hl, Al-Samadi A, Ekblom M, Markev n B,  strand-Grundstr m I, Wold M, Svedahl  r, Juhl Br, et al. (2016). Assessment of bone marrow lymphocytic status during tyrosine kinase inhibitor therapy and its relation to therapy response in chronic myeloid leukaemia.

Fang L, De, L., Ml, M., Rc, A., Jn, B., L, D., Aj, H., Sh, K., Jy, L., Jn, S., et al. (2013). The immune cell infiltrate populating meningiomas is composed of mature, antigen-experienced T and B cells.

Finn, O.J. (2017). Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow. *Cancer Immunol. Res.* *5*, 347–354.

Foley, E.J. (1953). Antigenic Properties of Methylcholanthrene-induced Tumors in Mice of the Strain of Origin. *Cancer Res.* *13*, 835–837.

Fujii, S.-I., Shimizu, K., Okamoto, Y., Kunii, N., Nakayama, T., Motohashi, S., and Taniguchi, M. (2013). NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front. Immunol.* *4*, 409.

Fujii S, K, S., M, K., and Rm, S. (2002). Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs.

Fujii Si, and K, S. (2019). Immune Networks and Therapeutic Targeting of iNKT Cells in Cancer.

Gabrilovich, G. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects.

Gannag , M., Abel, M., Michallet, A.-S., Delluc, S., Lambert, M., Giraudier, S., Kratzer, R., Niedermann, G., Saveanu, L., Guilhot, F., et al. (2005). Ex Vivo Characterization of Multiepitopic Tumor-Specific CD8 T Cells in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Implications for Vaccine Development and Adoptive Cellular Immunotherapy. *J. Immunol.* *174*, 8210–8218.

Gao, L., Bellantuono, I., Elsässer, A., Marley, S.B., Gordon, M.Y., Goldman, J.M., and Stauss, H.J. (2000). Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood* 95, 2198–2203.

Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht Lh, Craft J, and Yin Z (2003). Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity.

Gardner A, and Ruffell B (2016). Dendritic Cells and Cancer Immunity.

Gatti, R., and Ra, G. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review.

Giallongo, C., Parrinello, N., Brundo, M.V., Raccuia, S.A., Di Rosa, M., La Cava, P., and Tibullo, D. (2015). Myeloid Derived Suppressor Cells in Chronic Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* 5.

Giallongo C, Parrinello N, Tibullo D, La Cava P, Romano A, Chiarenza A, Barbagallo I, Palumbo Ga, Stagno F, Vigneri P, et al. (2014). Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) are increased and exert immunosuppressive activity together with polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in chronic myeloid leukemia patients.

Girardi, Cr, S., Jm, L., E, G., R, F., P, H., B, S., Re, T., and Ac, H. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells.

Godder Kt, Henslee-Downey Pj, Mehta J, Park Bs, Chiang Ky, Abhyankar S, and Lamb Ls (2007). Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation.

Godfrey, D.I., Uldrich, A.P., McCluskey, J., Rossjohn, J., and Moody, D.B. (2015). The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat. Immunol.* 16, 1114–1123.

Godfrey, D.I., Le Nours, J., Andrews, D.M., Uldrich, A.P., and Rossjohn, J. (2018). Unconventional T Cell Targets for Cancer Immunotherapy. *Immunity* 48, 453–473.

Godfrey Di, and Sp, B. (2007). Control points in NKT-cell development.

Goldrath Aw, Bogatzki Ly, and Bevan Mj (2000). Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation.

Goldrath Aw, Luckey Cj, Park R, Benoist C, and Mathis D (2004). The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation.

Gordon, S.M., Carty, S.A., Kim, J.S., Zou, T., Smith-Garvin, J., Alonzo, E.S., Haimm, E., Sant'Angelo, D.B., Koretzky, G.A., Reiner, S.L., et al. (2011). Requirements for Eomesodermin and Promyelocytic Leukemia Zinc Finger in the Development of Innate-Like CD8⁺ T Cells. *J. Immunol.* 186, 4573–4578.

Gros, A., Robbins, P.F., Yao, X., Li, Y.F., Turcotte, S., Tran, E., Wunderlich, J.R., Mixon, A., Farid, S., Dudley, M.E., et al. (2014). PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J. Clin. Invest.* 124, 2246–2259.

Gross, L. (1943). The Importance of Dosage in the Intradermal Immunization against Transplantable Neoplasms. *Cancer Res.* 3, 770–778.

Guilhot, F., Chastang, C., Michallet, M., Guerci, A., Harousseau, J.-L., Maloisel, F., Bouabdallah, R., Guyotat, D., Cheron, N., Nicolini, F., et al. (1997). Interferon Alfa-2b Combined with Cytarabine versus Interferon Alone in Chronic Myelogenous Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 337, 223–229.

Gutierrez-Arcelus M, N, T., Ar, M., Rb, P., A, N., H, K., S, H., K, S., Gfm, W., I, K., et al. (2019). Lymphocyte innateness defined by transcriptional states reflects a balance between proliferation and effector functions.

Haluszczyk, C., Akue, A.D., Hamilton, S.E., Johnson, L.D.S., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S.C., and Kedl, R.M. (2009). The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J. Exp. Med.* 206, 435–448.

Harding, H., Jg, M., Ja, G., Dh, R., and Jp, A. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones.

Hayashi Y, Nakamae H, Katayama T, Nakane T, Koh H, Nakamae M, Hirose A, Hagihara K, Terada Y, Nakao Y, et al. (2012). Different immunoprofiles in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, nilotinib or dasatinib.

Hochhaus, A., Baccarani, M., Silver, R.T., Schiffer, C., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Deininger, M.W., Guilhot, F., et al. (2020). European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 34, 966–984.

Hoffmann, Thomas K Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck - PubMed.

Hu, J., Sahu, N., Walsh, E., and August, A. (2007). Memory phenotype CD8+ T cells with innate function selectively develop in the absence of active Itk. *Eur. J. Immunol.* 37, 2892–2899.

Huang, A.C., Postow, M.A., Orlowski, R.J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S., Xu, W., Harmon, S., Giles, J.R., Wenz, B., et al. (2017). T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature* 545, 60–65.

Huck K, Feyen O, Niehues T, Rüschenndorf F, Hübner N, Laws Hj, Telieps T, Knapp S, Wacker Hh, Meindl A, et al. (2009). Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation.

Hughes A, Clarson J, Tang C, Vidovic L, White Dl, Hughes Tp, and Yong As (2017). CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors.

Hughes Tp, Mauro Mj, Cortes Je, Minami H, Rea D, DeAngelo Dj, Breccia M, Goh Yt, Talpaz M, Hochhaus A, et al. (2019). Asciminib in Chronic Myeloid Leukemia after ABL Kinase Inhibitor Failure.

Hussain, T., and Quinn, K.M. (2019). Similar but different: virtual memory CD8 T cells as a memory-like cell population. *Immunol. Cell Biol.* 97, 675–684.

Ilander, M., Olsson-Strömberg, U., Schlums, H., Guilhot, J., Brück, O., Lähteenmäki, H., Kasanen, T., Koskenvesa, P., Söderlund, S., Höglund, M., et al. (2016). Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*.

Im Sj, Hashimoto M, Gerner My, Lee J, Kissick Ht, Burger Mc, Shan Q, Hale Js, Lee J, Nasti Th, et al. (2016). Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy.

Imagawa, J., Tanaka, H., Okada, M., Nakamae, H., Hino, M., Murai, K., Ishida, Y., Kumagai, T., Sato, S., Ohashi, K., et al. (2015). Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 2, e528-535.

Imai K, Matsuyama S, S, M., K, S., and K, N. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population.

Inoue, H., and K, T. (2014). Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments.

Irani, Y.D., Hughes, A., Clarson, J., Kok, C.H., Shanmuganathan, N., White, D.L., Yeung, D.T., Ross, D.M., Hughes, T.P., and Yong, A.S.M. (2020). Successful treatment-free remission in chronic myeloid leukaemia and its association with reduced immune suppressors and increased natural killer cells. *Br. J. Haematol.* *n/a*.

Istaces, N., Splittgerber, M., Lima Silva, V., Nguyen, M., Thomas, S., Le, A., Achouri, Y., Calonne, E., Defrance, M., Fuks, F., et al. (2019). EOMES interacts with RUNX3 and BRG1 to promote innate memory cell formation through epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.* 10, 1–17.

Jacomet, F., Cayssials, E., Basbous, S., Levescot, A., Piccirilli, N., Desmier, D., Robin, A., Barra, A., Giraud, C., Guilhot, F., et al. (2015). Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. *Eur. J. Immunol.* 45, 1926–1933.

Jameson, S.C., Lee, Y.J., and Hogquist, K.A. (2015). Innate Memory T cells. *Adv. Immunol.* 126, 173–213.

Kaer, L.V. (2015). Innate and virtual memory T cells in man. *Eur. J. Immunol.* 45, 1916–1920.

Kawano T, J, C., Y, K., I, T., Y, K., K, M., H, U., R, N., H, S., E, K., et al. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides.

Kelly Jm, Darcy Pk, Jl, M., Di, G., K, T., H, Y., and Mj, S. (2002). Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection.

Kieper, W.C., and Jameson, S.C. (1999). Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naïve T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 13306–13311.

Kim, D.H., Kamel-Reid, S., Chang, H., Sutherland, R., Jung, C.W., Kim, H.-J., Lee, J.-J., and Lipton, J.H. (2009). Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica* *94*, 135–139.

Kim, E.Y., Lynch, L., Brennan, P.J., Cohen, N.R., and Brenner, M.B. (2015). The transcriptional programs of iNKT cells. *Semin. Immunol.* *27*, 26–32.

Kirkwood, J.M., Butterfield, L.H., Tarhini, A.A., Zarour, H., Kalinski, P., and Ferrone, S. (2012). Immunotherapy of cancer in 2012. *CA. Cancer J. Clin.* *62*, 309–335.

Kreiter, S., Vormehr, M., van de Roemer, N., Diken, M., Löwer, M., Diekmann, J., Boegel, S., Schrörs, B., Vascotto, F., Castle, J.C., et al. (2015). Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* *520*, 692–696.

Krzewski, K., and Strominger, J.L. (2008). The Killer's Kiss: The many functions of NK cell immunological synapses. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 597–605.

La Cava A, L, V.K., and None, F.-D.-S. (2006). CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators.

Labidy-Galy et al. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis - PubMed.

LaMarche, N.M., Kohlgruber, A.C., and Brenner, M.B. (2018). Innate T cells govern adipose tissue biology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *201*, 1827–1834.

Lamb Ls, Henslee-Downey Pj, Parrish Rs, Godder K, Thompson J, Lee C, and Gee Ap (1996). Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia.

Lambolez, F., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Thymic differentiation of TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\alpha$ + IELs. *Immunol. Rev.* *215*, 178–188.

Lanzer Kg, Cookenham T, Reiley Ww, and Blackman Ma (2018). Virtual memory cells make a major contribution to the response of aged influenza-naïve mice to influenza virus infection.

Lee, A., Park, S.P., Park, C.H., Kang, B.H., Park, S.H., Ha, S.-J., and Jung, K.C. (2015). IL-4 Induced Innate CD8+ T Cells Control Persistent Viral Infection. *PLOS Pathog.* *11*, e1005193.

Lee, J.-Y., Hamilton, S.E., Akue, A.D., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2013a). Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 13498–13503.

Lee, Y.J., Jung, K.C., and Park, S.H. (2009). MHC class II-dependent T–T interactions create a diverse, functional and immunoregulatory reaction circle. *Immunol. Cell Biol.* *87*, 65–71.

Lee, Y.J., Jeon, Y.K., Kang, B.H., Chung, D.H., Park, C.-G., Shin, H.Y., Jung, K.C., and Park, S.H. (2010). Generation of PLZF+ CD4+ T cells via MHC class II–dependent thymocyte–thymocyte interaction is a physiological process in humans. *J. Exp. Med.* *207*, 237–246.

Lee, Y.J., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2011). Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends Immunol.* *32*, 50–56.

Lee, Y.J., Holzapfel, K.L., Zhu, J., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2013b). Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat. Immunol.* *14*, 1146–1154.

Legoux F, Bellet D, Daviaud C, El Morr Y, Darbois A, Niort K, Procopio E, Salou M, Gilet J, Ryffel B, et al. (2019). Microbial metabolites control the thymic development of mucosal-associated invariant T cells.

Legoux F, Salou M, and Lantz O (2020). MAIT Cell Development and Functions: the Microbial Connection.

Leite-De-Moraes Mc, A, H., A, A., F, M., Y, K., E, S., Herbelin A, and Dy M (1999). A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement.

Li, X., Chen, G., Garcia-Navarro, R., Franck, R.W., and Tsuji, M. (2009). Identification of C-glycoside analogues that display a potent biological activity against murine and human invariant natural killer T cells. *Immunology* *127*, 216–225.

Li, Y., Lin, C., and Schmidt, C.A. (2012). New insights into antigen specific immunotherapy for chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell Int.* *12*, 52.

Li H, Lebedeva Mi, Llera As, Fields Ba, Brenner Mb, and Mariuzza Ra (1998). Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor.

Liao, X.C., and Littman, D.R. (1995). Altered T cell receptor signaling and disrupted T cell development in mice lacking *I κ k*. *Immunity* *3*, 757–769.

Lin, J., Mohrs, K., Szaba, F., Kummer, L., Leadbetter, E., and Mohrs, M. (2019). Virtual memory CD8 T cells expanded by helminth infection confer broad protection against bacterial infection. *Mucosal Immunol.* *12*, 258–264.

Ling, L., and Lu, J. (2018). Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med.* *7*, 4509–4516.

Ly, D., and Moody, D.B. (2014). The CD1 size problem: lipid antigens, ligands, and scaffolds. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 3069–3079.

Lynch L, X, M., S, Z., Pj, B., A, M., C, L., G, B., Ee, V.-D., M, T., Hf, K., et al. (2015). Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue.

Ma, D.Y., and Clark, E.A. (2009). The role of CD40 and CD40L in Dendritic Cells. *Semin. Immunol.* *21*, 265–272.

Mahon, F.X., Delbrel, X., Cony-Makhoul, P., Fabères, C., Boiron, J.M., Barthe, C., Bilhou-Nabéra, C., Pigneux, A., Marit, G., and Reiffers, J. (2002). Follow-Up of Complete Cytogenetic Remission in Patients With Chronic Myeloid Leukemia After Cessation of Interferon Alfa. *J. Clin. Oncol.* *20*, 214–220.

Mahon, F.-X., Réa, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., et al. (2010). Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* *11*, 1029–1035.

Maréchal R, De Schutter J, N, N., P, D., A, L., J, D., I, S., S, T., and Ji, V.L. (2010). Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients.

Martin, M.D., and Badovinac, V.P. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Front. Immunol.* *9*.

Martin E, Treiner E, Duban L, Guerri L, Laude H, Toly C, Premel V, Devys A, Moura Ic, Tilloy F, et al. (2009). Stepwise development of MAIT cells in mouse and human.

Martinet, V., Tonon, S., Torres, D., Azouz, A., Nguyen, M., Kohler, A., Flamand, V., Mao, C.-A., Klein, W.H., Leo, O., et al. (2015). Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8+ T cells. *Nat. Commun.* *6*.

Matsuda Ji, Ov, N., L, G., T, N., M, T., Cr, W., Y, K., and Kronenberg M (2000). Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers.

Matsuda Ji, T, M., J, S.-B., and L, G. (2008). CD1d-restricted iNKT cells, the “Swiss-Army knife” of the immune system.

McLane Lm, Abdel-Hakeem Ms, and Wherry Ej (2019). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer.

Mellqvist, U.-H., Hansson, M., Brune, M., Dahlgren, C., Hermodsson, S., and Hellstrand, K. (2000). Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine. *Blood* *96*, 1961–1968.

Messaoudene M, Fregni G, E, F.-N., J, C., E, M., S, M.-D., B, C., A, G., X, S.-G., S, A., et al. (2014). Mature cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma.

Michael A. Paley, Daniela C. Kroy, Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., et al. (2012). Progenitor and Terminal Subsets of CD8+ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science* *338*, 1220–1225.

Miller, C.H., Klawon, D.E.J., Zeng, S., Lee, V., Socci, N.D., and Savage, P.A. (2020). Eomes identifies thymic precursors of self-specific memory-phenotype CD8 + T cells. *Nat. Immunol.* *21*, 567–577.

Min, H.S., Lee, Y.J., Jeon, Y.K., Kim, E.J., Kang, B.H., Jung, K.C., Chang, C.-H., and Park, S.H. (2011). MHC Class II-Restricted Interaction between Thymocytes Plays an Essential Role in the Production of Innate CD8⁺ T Cells. *J. Immunol.*

Mohty, M., Jarrossay, D., Lafage-Pochitaloff, M., Zandotti, C., Brière, F., Lamballeri, X.-N. de, Isnardon, D., Sainy, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2001). Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood* 98, 3750–3756.

Mohty, M., Isnardon, D., Vey, N., Brière, F., Blaise, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2002). Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34⁺/CD38⁻ primitive haematopoietic progenitors. *Br. J. Haematol.* 119, 115–118.

Mohty, M., Jourdan, E., Mami, N.B., Vey, N., Damaj, G., Blaise, D., Isnardon, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2004). Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 103, 4666–4668.

Molldrem, J.J., Lee, P.P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H.M., Champlin, R.E., and Davis, M.M. (2000). Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* 6, 1018–1023.

Morris, S.E., Farber, D.L., and Yates, A.J. (2019). Tissue-Resident Memory T Cells in Mice and Humans: Towards a Quantitative Ecology. *J. Immunol.* 203, 2561–2569.

Mumprecht, S., Schürch, C., Schwaller, J., Solenthaler, M., and Ochsenbein, A.F. (2009). Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 114, 1528–1536.

Mustjoki, S., Ekblom, M., Arstila, T.P., Dybedal, I., Epling-Burnette, P.K., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Höglund, M., Kovanen, P., Laurinolli, T., et al. (2009). Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia* 23, 1398–1405.

Mustjoki S, Ekblom M, Arstila Tp, Dybedal I, Epling-Burnette Pk, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Höglund M, Kovanen P, Laurinolli T, et al. (2009). Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy.

Nagata Y, Ohashi K, Fukuda S, Kamata N, Akiyama H, and Sakamaki H (2010). Clinical features of dasatinib-induced large granular lymphocytosis and pleural effusion.

Nakajima H, Zhao R, Lund Tc, Ward J, Dolan M, Hirsch B, and Miller Js (2002). The BCR/ABL transgene causes abnormal NK cell differentiation and can be found in circulating NK cells of advanced phase chronic myelogenous leukemia patients.

Nicolini, F.E. (2017). CML stem cells: evasion for better invasion. *Blood* 129, 141–142.

O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., et al. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 994–1004.

O'Hare T, Shakespeare Wc, Zhu X, Eide Ca, Rivera Vm, Wang F, Adrian Lt, Zhou T, Huang Ws, Xu Q, et al. (2009). AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance.

Paget C, S, I, J, F., J, R., F, B., M, P., L, D., B, R., Jc, R., P, G., et al. (2012). Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages.

Pahl J, and Cerwenka A (2017). Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity.

Pannetier C, Even J, and Kourilsky P (1995). T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples.

Pfirschmann, M., Clark, R.E., Prejzner, W., Lauseker, M., Baccharani, M., Saussele, S., Guilhot, F., Heibl, S., Hehlmann, R., Faber, E., et al. (2020). The EUTOS long-term survival (ELTS) score is superior to the Sokal score for predicting survival in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 34, 2138–2149.

Pfirschmann M, Baccharani M, Saussele S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkoppele G, Hoffmann Vs, Castagnetti F, Hasford J, Hehlmann R, et al. (2016). Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia.

Pierson, B.A., and Miller, J.S. (1996). CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood* 88, 2279–2287.

Prince, A.L., Kraus, Z., Carty, S.A., Ng, C., Yin, C.C., Jordan, M.S., Schwartzberg, P.L., and Berg, L.J. (2014). Development of Innate CD4⁺ and CD8⁺ T cells in Itk-deficient mice are regulated by distinct pathways. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 688–699.

Prince Al, Yin Cc, Enos Me, Felices M, and Berg Lj (2009). The Tec kinases Itk and Rlk regulate conventional versus innate T-cell development.

Qazilbash, M.H., Wieder, E., Thall, P.F., Wang, X., Rios, R., Lu, S., Kanodia, S., Ruisaard, K.E., Giralt, S.A., Estey, E.H., et al. (2017). PR1 peptide vaccine induces specific immunity with clinical responses in myeloid malignancies. *Leukemia* 31, 697–704.

Qiu Zy, Xu W, and Li Jy (2014). Large granular lymphocytosis during dasatinib therapy.

Quinn, K.M., Fox, A., Harland, K.L., Russ, B.E., Li, J., Nguyen, T.H.O., Loh, L., Olshanksy, M., Naeem, H., Tsyganov, K., et al. (2018). Age-Related Decline in Primary CD8⁺ T Cell Responses Is Associated with the Development of Senescence in Virtual Memory CD8⁺ T Cells. *Cell Rep.* 23, 3512–3524.

Quinn Km, Hussain T, Kraus F, Formosa Le, Lam Wk, Dagle Mj, Saunders Ec, Assmus Lm, Wynne-Jones E, Loh L, et al. (2020). Metabolic characteristics of CD8⁺ T cell subsets in young and aged individuals are not predictive of functionality.

Rea, D., Henry, G., Khaznadar, Z., Etienne, G., Guilhot, F., Nicolini, F., Guilhot, J., Rousselot, P., Hugué, F., Legros, L., et al. (2017). Natural killer-cell counts are associated

with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. *Haematologica* 102, 1368–1377.

Rezvani K, Grube M, Brenchley Jm, Sconocchia G, Fujiwara H, Price Da, Gostick E, Yamada K, Melenhorst J, Childs R, et al. (2003). Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8⁺ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation.

Rhodes, D.A., Chen, H.-C., Price, A.J., Keeble, A.H., Davey, M.S., James, L.C., Eberl, M., and Trowsdale, J. (2015). Activation of Human $\gamma\delta$ T Cells by Cytosolic Interactions of BTN3A1 with Soluble Phosphoantigens and the Cytoskeletal Adaptor Periplakin. *J. Immunol.* 194, 2390–2398.

Rolot, M., Dougall, A.M., Chetty, A., Javaux, J., Chen, T., Xiao, X., Machiels, B., Selkirk, M.E., Maizels, R.M., Hokke, C., et al. (2018). Helminth-induced IL-4 expands bystander memory CD8⁺ T cells for early control of viral infection. *Nat. Commun.* 9, 1–16.

Rosenthal, R., El, C., R, S., Ma, B., Da, M., Ct, H., T, L., M, T., JI, R., K, J., et al. (2019). Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution.

Rossignol, A., Levescot, A., Jacomet, F., Robin, A., Basbous, S., Giraud, C., Roy, L., Guilhot, F., Turhan, A.G., Barra, A., et al. (2012a). Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur. J. Immunol.* 42, 1870–1875.

Rossignol, A., Levescot, A., Jacomet, F., Robin, A., Basbous, S., Giraud, C., Roy, L., Guilhot, F., Turhan, A.G., Barra, A., et al. (2012b). Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur. J. Immunol.* 42, 1870–1875.

Rossjohn J, Dg, P., O, P., L, G., and Di, G. (2012). Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells.

Rousselot, P., Charbonnier, A., Cony-Makhoul, P., Agape, P., Nicolini, F.E., Varet, B., Gardembas, M., Etienne, G., Réa, D., Roy, L., et al. (2014). Loss of Major Molecular Response As a Trigger for Restarting Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Patients With Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia Who Have Stopped Imatinib After Durable Undetectable Disease. *J. Clin. Oncol.* 32, 424–430.

Ruggeri L, Capanni M, E, U., K, P., Wd, S., A, T., S, P., D, R., F, F., F, A., et al. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants.

Sandstrom A, Peigné Cm, Léger A, Crooks Je, Konczak F, Gesnel Mc, Breathnach R, Bonneville M, Scotet E, and Adams Ej (2014). The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V γ 9V δ 2 T cells.

Saussele, S., Richter, J., Guilhot, J., Gruber, F.X., Hjorth-Hansen, H., Almeida, A., Janssen, J.J.W.M., Mayer, J., Koskenvesa, P., Panayiotidis, P., et al. (2018). Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol.* 19, 747–757.

Savage Ak, Mg, C., J, H., D, P., E, M., B, L., O, L., and A, B. (2008). The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage.

Schaeffer Em, Broussard C, Debnath J, Anderson S, McVicar Dw, and Schwartzberg Pl (2000). Tec family kinases modulate thresholds for thymocyte development and selection.

Schütz, C., Inselmann, S., Sausslele, S., Dietz, C.T., Müller, M.C., Eigendorff, E., Brendel, C.A., Metzelder, S.K., Brümmendorf, T.H., Waller, C., et al. (2017). Expression of the CTLA-4 ligand CD86 on plasmacytoid dendritic cells (pDC) predicts risk of disease recurrence after treatment discontinuation in CML. *Leukemia* 31, 829.

Seggewiss, R., Price, D., and Purbhoo, M. (2008). Immunomodulatory effects of imatinib and second-generation tyrosine kinase inhibitors on T cells and dendritic cells: an update. *Cytotherapy* 10, 633–641.

Shaler Cr, Tun-Abraham Me, Skaro Ai, Khazaie K, Corbett Aj, Mele T, Hernandez-Alejandro R, and Haeryfar Smm (2017). Mucosa-associated invariant T cells infiltrate hepatic metastases in patients with colorectal carcinoma but are rendered dysfunctional within and adjacent to tumor microenvironment.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.

Shissler Sc, and Tj, W. (2019). The ins and outs of type I iNKT cell development.

Smith Nl, Patel Rk, Reynaldi A, Grenier Jk, Wang J, Watson Nb, Nzingha K, Yee Mon Kj, Peng Sa, Grimson A, et al. (2018). Developmental Origin Governs CD8 + T Cell Fate Decisions during Infection.

Smyth, M., Di, G., and Ja, T. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy.

Smyth Mj, Ky, T., Se, S., E, C., Ja, T., M, T., T, K., Sb, P., Ny, C., and Di, G. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells.

Sokal, J.E., Cox, E.B., Baccarani, M., Tura, S., Gomez, G.A., Robertson, J.E., Tso, C.Y., Braun, T.J., Clarkson, B.D., and Cervantes, F. (1984). Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood* 63, 789–799.

Song L, S, A., J, S., K, E., Hw, W., R, S., T, A., Am, S., Ya, D., Rc, S., et al. (2009). Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages.

Sopper, S., Mustjoki, S., White, D., Hughes, T., Valent, P., Burchert, A., Gjertsen, B.T., Gastl, G., Baldauf, M., Trajanoski, Z., et al. (2016). Reduced CD62L Expression on T Cells and Increased Soluble CD62L Levels Predict Molecular Response to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Early Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 35, 175–184.

Sorel N, Cayssials É, Brizard F, and Chomel Jc (2017). Treatment and molecular monitoring update in chronic myeloid leukemia management.

- Starzl, T., I. P., and Cg, H. (1970). Immunosuppression and malignant neoplasms.
- Summers deLuca, S. deLuca, and Gommerman JI (2012). Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily.
- Takeda K, Y, H., L, V.K., H, M., H, Y., and K, O. (2000). Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis.
- Tanno H, K, K., E, K., A, S., N, T., H, Y., K, I., Y, I., R, M., and M, T. (2017). Invariant NKT cells promote skin wound healing by preventing a prolonged neutrophilic inflammatory response.
- Tarafdar A, Hopcroft Le, Gallipoli P, Pellicano F, Cassels J, Hair A, Korfi K, Jørgensen Hg, Vetrie D, Holyoake TI, et al. (2017). CML cells actively evade host immune surveillance through cytokine-mediated downregulation of MHC-II expression.
- Tosolini, M., A, K., B, M., T, F., S, M., G, B., A, B., P, B., Wh, F., F, P., et al. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer.
- Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticati P, Gilfillan S, and Lantz O (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1.
- Tun Am, and Ansell Sm (2020). Immunotherapy in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: Innate, adaptive and targeted immunological strategies.
- Van den Broek, D, K., F, O., R, T., S, V., Wk, L., Cj, M., Rm, Z., and H, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice.
- van der Windt Gj, and Pearce El (2012). Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development.
- Vantourout P, and Hayday A (2013). Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology.
- Vavassori S, Kumar A, Wan Gs, Ramanjaneyulu Gs, Cavallari M, El Daker S, Beddoe T, Theodossis A, Williams Nk, Gostick E, et al. (2013). Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells.
- Veeramani S, Wang Sy, C, D., S, B., L, J., T, K., A, B., Bk, L., and Gj, W. (2011). Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism.
- Verfaillie, C., Miller, W., Kay, N., and McGlave, P. (1989). Adherent lymphokine-activated killer cells in chronic myelogenous leukemia: a benign cell population with potent cytotoxic activity. *Blood* 74, 793–797.
- Verykokakis, M., Boos, M.D., Bendelac, A., and Kee, B.L. (2010). SAP Protein-Dependent Natural Killer T-like Cells Regulate the Development of CD8+ T Cells with Innate Lymphocyte Characteristics. *Immunity* 33, 203–215.

- Vigneron, V. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy.
- Vivier E, Tomasello E, M, B., T, W., and S, U. (2008). Functions of natural killer cells.
- Wang Qj, Hanada K, Pf, R., Yf, L., and Jc, Y. (2012). Distinctive features of the differentiated phenotype and infiltration of tumor-reactive lymphocytes in clear cell renal cell carcinoma.
- Warren Hs, Rana Pm, Rieger Dt, Hewitt Ka, Dahlstrom Je, and Kent Al (2006). CD8 T cells expressing killer Ig-like receptors and NKG2A are present in cord blood and express a more naïve phenotype than their counterparts in adult blood.
- Weinreich, M.A., Odumade, O.A., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2010a). T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 709–716.
- Weinreich, M.A., Odumade, O.A., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2010b). PLZF+ T cells regulate memory-like CD8+ T cell development. *Nat. Immunol.* *11*, 709–716.
- Wesley Jd, Ms, T., D, C., and L, B. (2008). NK cell-like behavior of Valpha14i NK T cells during MCMV infection.
- Weulersse M, Asrir A, Pichler Ac, Lemaitre L, Braun M, Carrié N, Joubert Mv, Le Moine M, Do Souto L, Gaud G, et al. (2020). Eomes-Dependent Loss of the Co-activating Receptor CD226 Restrains CD8 + T Cell Anti-tumor Functions and Limits the Efficacy of Cancer Immunotherapy.
- White, J.T., Cross, E.W., Burchill, M.A., Danhorn, T., McCarter, M.D., Rosen, H.R., O'Connor, B., and Kedl, R.M. (2016). Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner. *Nat. Commun.* *7*, 1–13.
- White Jt, Cross Ew, and Kedl Rm (2017). Antigen-inexperienced memory CD8 + T cells: where they come from and why we need them.
- Wingender G, P, K., B, B., and M, K. (2010). Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency.
- Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Silva, R.B. da, Sousa, C.R. e, Green, D.R., Oberst, A., and Albert, M.L. (2015). RIPK1 and NF- κ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8+ T cells. *Science* *350*, 328–334.
- Yong As, Stephens N, Weber G, Li Y, Savani Bn, Eniafe R, Keyvanfar K, Kurlander R, Rezvani K, and Barrett Aj (2011). Improved outcome following allogeneic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia is associated with higher expression of BMI-1 and immune responses to BMI-1 protein.
- Zahran Am, Badrawy H, and Ibrahim A (2014). Prognostic value of regulatory T cells in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients.
- Zha, X., Yan, X., Shen, Q., Zhang, Y., Wu, X., Chen, S., Li, B., Yang, L., Geng, S., Weng, J., et al. (2012). Alternative expression of TCR ζ related genes in patients with chronic myeloid leukemia. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* *5*, 74.

Zheng, C., Zheng, L., Yoo, J.-K., Guo, H., Zhang, Y., Guo, X., Kang, B., Hu, R., Huang, J.Y., Zhang, Q., et al. (2017). Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell* 169, 1342–1356.e16.

ZHOU, J., NAGARKATTI, P., ZHONG, Y., and NAGARKATTI, M. (2011). Characterization of T-Cell Memory Phenotype after In Vitro Expansion of Tumor-infiltrating Lymphocytes from Melanoma Patients. *Anticancer Res.* 31, 4099–4109.

Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.-M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.-H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8⁺ T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* 33, 229–240.

Zhou D, J, M., C, C., N, S., N, Y., Y, G., Y, S., K, H., Yp, W., T, Y., et al. (2004). Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells.

Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 715–727.

ANNEXES

ANNEXE 1 : JACOMET ET AL., EUR.J. IMMUNOL. 2015

1926

Florence Jacomet et al.

DOI: 10.1002/eji.201545539

Eur. J. Immunol. 2015. 45: 1926–1933

Frontline

European Journal of
Immunology

FRONTLINE

Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8⁺ KIR/NKG2A⁺ T cells in human adults and cord blood samples

Florence Jacomet^{1,2,3,4}, Emilie Cayssials^{1,3,4}, Sara Basbous^{1,4}, Anaïs Levescot^{1,5,6}, Nathalie Piccirilli³, Deborah Desmier^{1,3,4}, Aurélie Robin^{3,6}, Anne Barra^{1,2,3,4}, Christine Giraud^{1,3,7}, François Guilhot^{3,4,8,9}, Lydia Roy^{3,4,8,9}, André Herbelin^{*3,4,6} and Jean-Marc Gombert^{*1,2,3,4}

¹ INSERM UMR S935, Poitiers and Villejuif, France

² Service d'Immunologie et Inflammation, Poitiers, France

³ CHU de Poitiers, Poitiers, France

⁴ Université de Poitiers, Poitiers, France

⁵ Université Paris-Sud 11, Orsay, France

⁶ INSERM 1082, Poitiers, France

⁷ Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Site de Poitiers, Poitiers, France

⁸ Centre d'investigation clinique INSERM-1402, Poitiers, France

⁹ Service d'Oncologie Hématologique et Thérapie Cellulaire, Poitiers, France

Polyclonal CD8⁺ T cells, with a marked innate/memory phenotype, high eomesodermin (Eomes) expression, and the capacity to generate IFN- γ rapidly without prior exposure to antigen, have been described in mice. However, even though a pool of human CD8⁺ T cells expressing killer Ig-like receptors (KIRs) was recently documented, the existence of a human equivalent of murine innate/memory CD8⁺ T cells remains to be established. Here, we provide evidence for a population of KIR/NKG2A⁺ CD8⁺ T cells in healthy human adults sharing the same features, namely increased Eomes expression, prompt IFN- γ production in response to innate-like stimulation by IL-12+IL-18, and a potent antigen-independent cytotoxic activity along with a preferential terminally differentiated effector memory phenotype. None of the above functional characteristics applied to the KIR/NKG2A⁻ fraction of the Eomes⁺ CD8⁺ T-cell population, thereby underlining the ability of KIR/NKG2A to distinguish between "innate/memory-like" and "conventional/memory" pools of CD8⁺ T cells. Remarkably, KIR/NKG2A⁺ Eomes⁺ CD8⁺ T cells with innate-like functions and a memory/terminally differentiated effector memory phenotype were also identified in human cord blood, suggesting that their development did not depend on cognate antigens. Taken together, our results support the conclusion that CD8⁺ T cells co-expressing Eomes and KIR/NKG2A may represent a new, functionally distinct "innate/memory-like" subset in humans.

Keywords: Innate-memory T cells · Innate immunity · CD8⁺ T cells · Cord blood · Human



See accompanying Commentary by Luc Van Kaer



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Correspondence: Dr. Jean-Marc Gombert
e-mail: jean-marc.gombert@chu-poitiers.fr

*These authors contributed equally to this work as senior authors.

Introduction

The term “innate T cell” was first assigned to a distinct lineage of murine T cells with a memory phenotype that develops in the thymus and rapidly secretes large amounts of cytokines upon TCR stimulation. This population includes cells restricted by MHC class Ib molecules, with limited tissue distribution and polymorphism [1]. Several polyclonal CD8⁺ T-cell subsets have subsequently been described in mice deficient in Itk kinase, T-cell signaling molecules or transcription factors, with functional and phenotypic features similar to those characterizing innate T cells [1–4]. Finally, the developmental regulation of innate CD8⁺ T cells occurs in inbred mouse strains, thereby proving its physiological relevance [3]. In this regard, they resemble virtual memory T cells [5, 6], which likewise display a marked innate/memory CD8 phenotype associated with pronounced expression of the transcription factor *Eomes* (*Eomes*). Moreover, they share their capacity to rapidly produce large amounts of IFN- γ in response to innate-like stimulation by IL-12+IL-18 with NK cells [7, 8]. Even though their involvement in the control of bacterial infections has been demonstrated in two studies [6, 7], the actual physiological significance of innate/memory CD8⁺ T cells has not yet been clearly established.

To date, it is uncertain whether an equivalent of these innate CD8⁺ T cells exists in humans. Although human CD8⁺ T cells expressing killer cell Ig-like receptors (KIR) have been described [9–11], it is not known whether they express a marked innate/memory phenotype together with high levels of *Eomes* or innate functions, such as rapid TCR-independent IFN- γ production. We have addressed this issue in the present study, which provides strong evidence of the existence of innate-like CD8⁺ T cells in humans.

Results and discussion

Eomes-expressing innate-like CD8⁺ T cells are detected in adult humans

While human CD8⁺ T cells with a marked NK-like (CD56, KIR, NKG2A) phenotype have been identified in PBMCs [9–11], their *Eomes* expression pattern has not been assessed. We found that 7.5% of total CD8⁺ T cells from healthy adults expressed KIR and NKG2A (Supporting Information Fig. 1), which is similar to the previously reported proportion [9–11]. Remarkably, 55% of these NK-like CD8⁺ T cells expressed *Eomes* (Fig. 1A), which amounts to 2.5% of the total CD8⁺ T pool (Supporting Information Fig. 1). In comparison, only 24% of their KIR⁻/NKG2A⁻ counterparts and 26% of total CD8⁺ T cells were positive for the transcription factor (Fig. 1A). These data are consistent with a preferential link between *Eomes* expression and the NK-like phenotype in peripheral blood CD8⁺ T cells. Overall, the KIR/NKG2A⁺ fraction that expresses *Eomes* responded to IL-12+IL-18 by generating IFN- γ (Fig. 1B), as was the case in their murine “innate-memory”

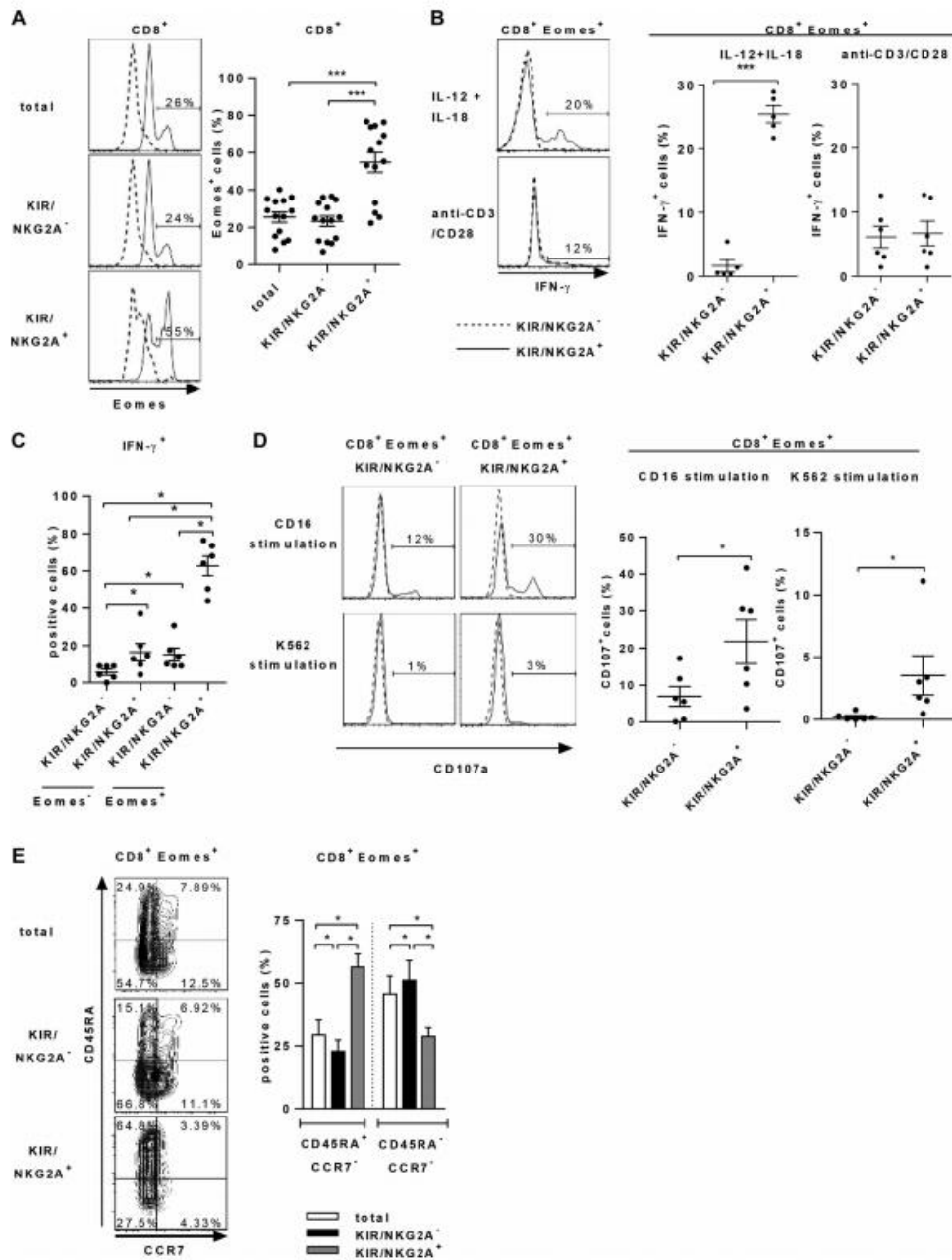
CD8⁺ T counterparts [7, 8]. The fact that this functional reactivity to IL-12+IL-18 was not found in the KIR/NKG2A⁻ fraction of the *Eomes*⁺CD8⁺ T cell population, clearly designates KIR/NKG2A molecules as a useful means of distinguishing between “innate/memory”-like and “conventional/memory” pools of CD8⁺ T cells in our experimental setup. As expected, the pool of *Eomes*-expressing cells, which presumably contains conventional effector CD8⁺ T cells, produced IFN- γ upon TCR engagement, in accordance with the similar frequency of responder *Eomes*⁺CD8⁺ T cells in the KIR/NKG2A⁺ and KIR/NKG2A⁻ cell compartments (Fig. 1B). Finally, it turned out that the majority (nearly 60%) of CD8⁺ T cells that produced IFN- γ in response to IL-12+IL-18 co-expressed *Eomes* and KIR/NKG2A, as opposed to only 15–20% of those expressing either KIR/NKG2A or *Eomes* (Fig. 1C). Remarkably, nearly 60% of the *Eomes*⁺ subset among KIR/NKG2A⁺CD8⁺ T cells co-expressed T-box transcription factor (T-bet), whereas virtually all KIR/NKG2A⁻CD8⁺ T cells, including the minor fraction expressing *Eomes*, were T-bet⁻ (Fig. 2A). Such a selective co-expression, which recalls the *Eomes*⁺T-bet⁺ CD8⁺ T-cell fraction that has been reported as confined in the pool of innate/memory CD8⁺ T cells in naive mice [3], suggests that the two transcription factors might cooperate in promoting critical functions in the KIR/NKG2A⁺ CD8⁺ T-cell subpopulation. The co-expression also identifies the major IL-12+IL-18 responders among the CD8⁺ T-cell subset, thereby providing definite evidence of the existence of innate-like CD8⁺ T cells in adult humans.

Human *Eomes*⁺KIR/NKG2A⁺CD8⁺ T cells exert cytolytic activity in a TCR-independent manner

We next tried to determine whether human innate-like CD8⁺ T cells shared with NK cells the capacity to exert cytolytic activity in a TCR-independent manner. This was clearly the case, since KIR/NKG2A⁺*Eomes*⁺CD8⁺ T cells, but not their KIR/NKG2A⁻ counterpart, were endowed with natural cytotoxicity both in an antibody-dependent manner through human CD16 as a lysis receptor and against MHC class I⁻ human K562 target cells, as shown in a single-cell assay using CD107 expression as a surrogate marker for cytotoxicity (Fig. 1D). Consistently with the key role attributed to IL-15 as an essential mediator of peripheral NK cells [12–14], IL-15 prestimulation led to a significant increase of CD16-mediated natural cytotoxicity in *Eomes*⁺KIR/NKG2A⁺CD8⁺ T cells, presumably via induction of CD16 cell surface expression (unpublished observations). As to the cytotoxicity against K562 target cells, *Eomes*⁺KIR/NKG2A⁺CD8⁺ T cells but not their *Eomes*⁺KIR/NKG2A⁻ counterparts, induced degranulation.

Eomes⁺KIR/NKG2A⁺CD8⁺ T cells are terminally differentiated effector cells

Based on the phenotype of their murine equivalent, we hypothesized that cells exhibiting a memory phenotype should be highly



represented within human innate-like CD8⁺ T cells. As illustrated in Figure 1E, among Eomes⁺CD8⁺ T cells, the KIR/NKG2A⁺ subset was enriched in CD45RA⁺CCR7⁻ effector cells, which represent the most differentiated type of memory cells, also called terminally differentiated effector memory (T_{EMRA}) [15], whereas the KIR/NKG2A⁻ subset primarily consisted in effector memory cells (CD45RA⁺CCR7⁻). Moreover, nearly 45% of KIR/NKG2A⁺ cells expressed CD57, as opposed to 15% in their KIR/NKG2A⁻ counterparts (Fig. 2B), thereby confirming that the KIR/NKG2A-expressing CD8⁺ T-cell subset is preeminently terminally differentiated, in accordance with a recent report [9].

KIR/NKG2A⁺CD8⁺ T cells expressing high levels of Eomes preexist in human cord blood

Knowing that mouse “innate/memory” CD8⁺ T cell development occurs mostly in the thymus, we looked for human innate/memory-like CD8⁺ T cells in cord blood. In accordance with a recent study [16], we were able to identify KIR and NKG2A receptors in a small proportion (range 0.7–1.7%) of CD8⁺ T cells in cord blood (Fig. 3A). Similarly to those circulating in adult blood, they expressed Eomes preferentially, as compared with KIR/NKG2A⁻CD8⁺ T cells (Fig. 3A and B). Moreover, the KIR/NKG2A⁺Eomes⁺CD8⁺ T-cell fraction contained a sizable majority of T_{EMRA} cells (Fig. 3C) even though, in contrast with adult blood, they were mainly CD57⁻ (Supporting Information Fig. 2A). This finding is in agreement with the notion that despite their memory/T_{EMRA} phenotype, KIR/NKG2A⁺ cells expressing Eomes in cord blood are less differentiated than those recovered from the blood of adult donors [16]. Like their peripheral counterparts, most cord blood KIR/NKG2A⁺Eomes⁺CD8⁺ T cells expressed T-bet (Supporting Information Fig. 2B) and produced IFN- γ in response to stimulation by IL-12+IL-18 and PMA-ionomycin (Fig. 3D), thereby corroborating the conclusion that their innate functions had been acquired prior to exposure to

antigens in peripheral lymphoid organs. These data, along with previous identification of Eomes⁺CD8⁺ T cells in human fetal spleen [17], suggest that these cells might actively contribute to the innate immune response against various pathogens in the human perinatal period. In the mouse, a key role in Eomes upregulation has been attributed to promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) expressing T cells, such as iNKT cells through their IL-4 production [2, 3]. However, challenging this model, two recent studies support the view that IL-4 induces development of innate/memory CD8⁺ T cells in a $\gamma\delta$ T and iNKT cell-independent manner [18, 19]. Even though the mechanisms underlying the generation and/or maintenance of innate/memory CD8⁺ T cells in humans remain to be identified, our data in cord blood showing a close correlation between frequencies of Eomes-expressing KIR⁺CD8⁺ cells and PLZF relative MFI in CD3⁺ cells (Supporting Information Fig. 3) are consistent with a possible requirement of PLZF-expressing T cells.

More generally, based on our demonstration that peripheral KIR⁺Eomes⁺CD8⁺ T cells display innate functions, including cytotoxic activity and rapid IFN- γ production after exposure to proinflammatory cytokines, we hypothesize that this new subset may be involved during infection or tumorigenesis in humans. If this were so, a possible correlation between iNKT cell immune subversion and innate-like CD8⁺ T cell dysfunctions, and ultimately with disease burden, would be worth investigating.

Concluding remarks

Taken together, our results provide definite evidence for the existence of a new population of antigen-inexperienced CD8⁺ T cells in humans that are characterized by a marked innate/memory phenotype as well as NK-like functions. Their potential role in disease control in conjunction with iNKT cells, which have been documented for their antitumoral and anti-infectious activities [20–23], deserves future consideration.

Figure 1. Identification of Eomes-expressing innate-like CD8⁺ T cells in healthy adult humans. (A) Eomes expression among PBMCs was analyzed by flow cytometry after gating on total, KIR/NKG2A⁻ and KIR/NKG2A⁺ CD8⁺CD3⁺ populations. One representative sample is shown (left). Eomes expression: gray solid lines; Isotype control: gray dotted lines. Numbers indicate the frequencies of Eomes-expressing cells. Cohort data are shown (n = 14). Wilcoxon-matched pairs test. ***p < 0.001. (B–C) PBMCs were cultured for (B and C) 48 h with IL-12+IL-18 or (C) for 16 h with anti-CD3/CD28 beads. (B) IFN- γ expression was analyzed after gating on Eomes⁺ CD8⁺ T cells and one representative sample is shown (left). The numbers indicate the frequencies of IFN- γ -expressing cells. Full cohort data are shown (right). The frequencies of IFN- γ -expressing cells (mean \pm SEM) after IL-12+IL-18 stimulation (n = 5) in KIR/NKG2A⁻ (1.7% \pm 1.0) and KIR/NKG2A⁺ (25.4% \pm 1.3) CD8⁺CD3⁺ cell populations (left), and after TCR-dependent stimulation (n = 6) in KIR/NKG2A⁻ (6.2% \pm 1.7) and KIR/NKG2A⁺ (6.7% \pm 1.9) CD8⁺CD3⁺ cell populations (right), are shown. The frequency of IFN- γ -expressing cells among the KIR/NKG2A⁺ fraction, when cultured in medium alone, was lower than 1%. Paired t-test. ***p < 0.001. (C) Eomes and KIR/NKG2A expression were analyzed among PBMCs after gating on IFN- γ -expressing CD8⁺CD3⁺ cells. Wilcoxon-matched pairs test. *p < 0.05. (D) PBMCs were preincubated for 48 h with IL-15 and cytotoxicity in the form of CD107a degranulation/expression was evaluated by flow cytometry. One representative sample is shown (left). Each histogram shows expression of CD107a (gray-line histogram) in comparison with an isotype control (dotted-line histogram). Numbers indicate the frequencies of CD107a-expressing cells. The full cohort data are shown (right). Frequencies of CD107a-expressing cells (mean \pm SEM; n = 6) in KIR/NKG2A⁻ (6.9% \pm 2.7) and KIR/NKG2A⁺ (21.8% \pm 5.9) Eomes⁺CD8⁺CD3⁺ cell populations after CD16 stimulation (left graph), and in KIR/NKG2A⁻ (0.2% \pm 0.1) and KIR/NKG2A⁺ (3.5% \pm 1.6) Eomes⁺CD8⁺CD3⁺ cell populations after K562 target cell stimulation (right graph). Wilcoxon-matched pairs test. *p < 0.05. (E) The frequencies (mean \pm SEM; n = 6) of CD45RA⁺/CCR7⁻ (EMRA) and CD45RA⁻/CCR7⁻ (effector memory) cells were analyzed among PBMCs by flow cytometry after gating on total (28.8% \pm 4.9 and 45.7% \pm 7.1, respectively), KIR/NKG2A⁻ (22.8% \pm 4.6 and 51.1% \pm 7.8, respectively) and KIR/NKG2A⁺ (55.7% \pm 4.3 and 28.8% \pm 3.4, respectively) Eomes⁺CD8⁺CD3⁺ cell populations. Numbers represent the frequency of cells within the indicated quadrant. Wilcoxon-matched pairs test. *p < 0.05. (A–D) Each symbol represents one healthy adult donor. Data have been pooled from three to five separate experiments.

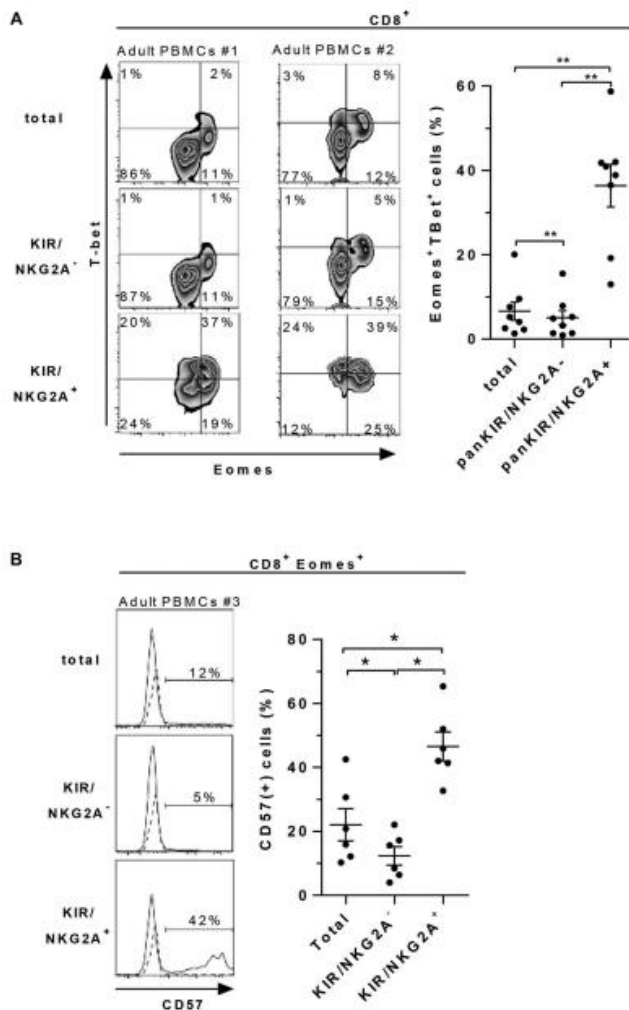


Figure 2. Analysis of expression of T-bet and CD57 by Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ CD8⁺ T cells in adult peripheral blood. (A) Adult PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, and anti-pan-KIR/NKG2A-PE, fixed and permeabilized, and then stained with anti-Eomes-AF647 and anti-T-bet-PerCPy5.5 for flow cytometric analysis. Intracellular T-bet and Eomes expression was analyzed after gating on total, KIR/NKG2A⁻ and KIR/NKG2A⁺ CD8⁺ CD3⁺ cell populations. Dot plot graph: data are two representative samples out of eight evaluated. Numbers in each top right quadrant represent the percentages of cells co-expressing Eomes and T-bet among the indicated population. Cohort data: percentage of Eomes⁺ T-bet⁺ cells (mean ± SEM) in total (6.6 ± 2.2), KIR/NKG2A⁻ (5.1 ± 1.7) and KIR/NKG2A⁺ (36.4 ± 4.0) CD8⁺ CD3⁺ cell populations. Wilcoxon nonparametric test. **p* < 0.01. (B) Adult PBMCs (*n* = 6) were membrane-labeled with anti-CD3-BV421, anti-CD8-PECy7, anti-pan-KIR/NKG2A-PE, and anti-CD57-FITC, fixed and permeabilized, and then stained with anti-Eomes-AF647. Cell-surface expression of CD57 was analyzed after gating on Eomes⁺ CD8⁺ CD3⁺ cells in the indicated populations. Graph overlays: one representative sample is shown. Numbers indicate the frequencies of CD57-expressing cells. Cohort data: percentage of CD57-expressing cells (mean ± SEM) in total (22.1 ± 5.0), KIR/NKG2A⁻ (12.3 ± 2.9) and KIR/NKG2A⁺ (46.6 ± 4.6) CD8⁺ CD3⁺ cell populations. Wilcoxon nonparametric test. **p* < 0.05. Data have been pooled from three separate experiments.

Materials and methods

This section was written in compliance with minimal information about T-cell assays guidelines.

PBMCs and cord blood mononuclear cells (CBMCs)

Healthy adult individuals were volunteers from the Pôle Biologie Santé (Poitiers, France). Cord blood samples were provided by the Etablissement Français du Sang (Poitiers, France). The study

was approved by the local Institutional Review Board. Peripheral and cord blood were collected in standard heparinized tubes, and PBMCs and cord blood mononuclear cells (CBMCs) were then separated by gradient centrifugation (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Reagents

Human rIL-12, rIL-18 (20 ng/mL together), and rIL-15 (10 ng/mL) were from R&D Systems (Abingdon, UK). PMA-ionomycin (1 ng/mL PMA, 0.5 μg/mL calcium ionophore) and Dynabeads

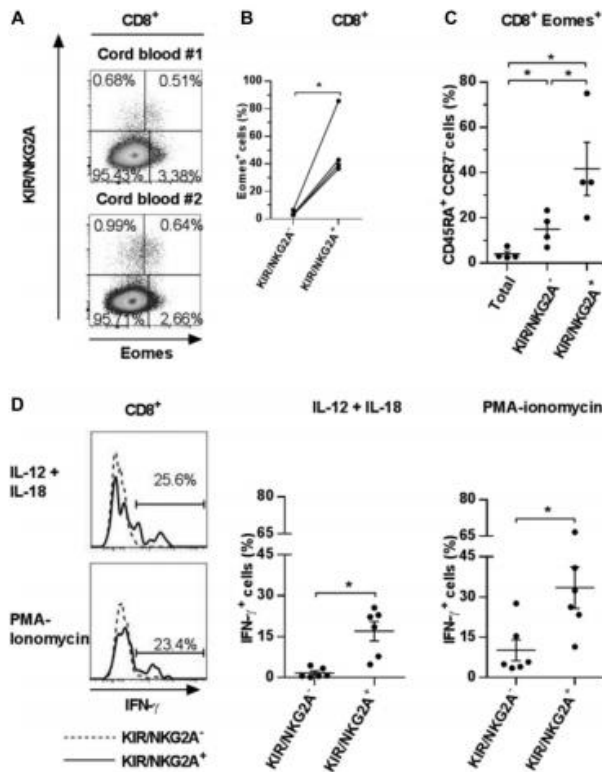


Figure 3. Eomes-expressing innate-like CD8 T cells pre-exist in cord blood. (A, B) Identification of Eomes-expressing KIR/NG2A⁺CD8⁺ T cells in CBMCs. (A) Two representative samples. Eomes and KIR/NG2A expression was analyzed by flow cytometry after gating on CD8⁺CD3⁺ cells. Numbers represent the frequency of cells within the indicated quadrant. (B) Cohort data are shown (n = 4). Frequencies of Eomes-expressing cells (mean ± SEM) in KIR/NG2A⁻ (2.7% ± 1.8) and KIR/NG2A⁺ (36.6% ± 11.6) CD8⁺CD3⁺ cell populations. Paired t-test. *p < 0.05. (C) Cord blood KIR/NG2A⁺CD8⁺ T cells were evaluated for CD45RA and CCR7 expression by flow cytometry. The frequencies (mean ± SEM; n = 4) of CD45RA⁺/CCR7⁺ (EMRA) cells among total, KIR/NG2A⁻, and KIR/NG2A⁺ Eomes⁺ CD8⁺CD3⁺ cell populations are 4.0% ± 1.2, 15.2% ± 3.6, and 41.7% ± 11.7, respectively. Paired t-test. *p < 0.05. (D) CBMCs were cultured for 48 h with IL-15 prior to stimulation with IL-12+IL-18 for 48 h or PMA-ionomycin for 4 h. Expression of IFN-γ was analyzed by flow cytometry after gating on CD8⁺CD3⁺ cells. One representative sample is shown for each mode of stimulation (IL-12+IL-18 and PMA-ionomycin, right). Each histogram represents expression of IFN-γ in KIR/NG2A⁺CD8⁺CD3⁺ cells (black line histogram) in comparison with KIR/NG2A⁻CD8⁺CD3⁺ cells (dashed line histogram). Numbers indicate the frequencies of IFN-γ-expressing cells in the KIR/NG2A⁺CD8⁺CD3⁺ cell population. Cohort data are shown (right). Frequencies of IFN-γ-expressing cells (mean ± SEM) after IL-12+IL-18 stimulation (n = 6) in KIR/NG2A⁻ (1.6% ± 0.7) and KIR/NG2A⁺ (17.0% ± 3.5) populations (left graph), and after PMA-ionomycin stimulation (n = 6) in KIR/NG2A⁻ (10.2% ± 3.9) and KIR/NG2A⁺ (33.5% ± 7.7) populations (right graph). The frequency of IFN-γ-expressing cells among KIR/NG2A⁺ cells, when cultured in medium alone, was lower than 1%. Wilcoxon-matched pairs test. *p < 0.05. (B–D) Each symbol represents one cord blood sample. Data have been pooled from two to three separate experiments.

Human T-activator CD3/CD28 were from Sigma-Aldrich and Invitrogen (Carlsbad, CA), respectively.

mAbs and flow cytometric analysis

Phenotypic analysis of PBMCs and CBMCs was performed by flow cytometry either ex vivo or after culture (1 × 10⁶ cells/mL). Expression of different markers was assessed by staining with appropriate combinations of mAbs conjugated directly to fluorochromes and directed against CD3, CD8, CD107a, T-bet, and IFN-γ from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France); KIR2D+KIR3DL1/KIR3DL2 (CD158e/k)+NKG2A (CD159a), referred to as pan-KIR/NG2A, and CD45RA from MiltenyiBiotec (Bergisch Gladbach, Germany); CD16, CD57, and IFN-γ from Biolegend (San Diego, CA); Eomes from eBioscience (San Diego, CA); and CCR7 from R&D Systems. Dead cells were excluded by using the Live/Dead Fixable NearIR Dead Cell Stain kit (Life Technologies). For nuclear Eomes and/or T-bet staining and intracytoplasmic IFN-γ staining, cells were permeabilized with an anti-human Foxp3 staining kit (eBioscience) and

a Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences), respectively [24]. Cells were analyzed by six- or eight-color flow cytometry (FACS Cantoll or FACSVerse cytometer and FACSDiva and FACS Suite softwares, BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo Software (TreeStar, Ashland, OR).

Cell cultures

All cell cultures (1 × 10⁶ cells/mL) were performed in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS and antibiotics. Cells were seeded into 24-well plates for IFN-γ assays or 96-well round (U) bottom culture plates for CD107a degranulation assays.

IFN-γ analysis

To determine the intracytoplasmic expression of IFN-γ, PBMCs (1 × 10⁶ cells/mL) were cultured for 48 h in the presence or absence of IL-12 and IL-18. For stimulation with anti-CD3 and

anti-CD28 antibodies, cells were incubated for 16 h with Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (Invitrogen) at the concentration recommended by the manufacturer. CBMCs (1×10^6 cells/mL) were preincubated for 48 h with IL-15 prior to addition of IL-12 and IL-18 or PMA-ionomycin. To stimulate with PMA-ionomycin (1 ng/mL PMA, 0.5 μ g/mL calcium ionophore, all from Sigma-Aldrich), CBMCs were incubated with medium alone for 44 h followed by 4 h of stimulation with the agent. Golgistop (BD Biosciences) was added in the last 4 h of culture.

CD107a degranulation assay

PBMCs were cultured for 48 h with rIL-15 prior to CD16 triggering or incubation with K562 target cells. For anti-CD16 triggering, wells were precoated with 10 μ g/mL Ultra-LEAF purified anti-human CD16 mAb or the corresponding isotype control provided by Biologend and washed prior to addition of IL-15-presentation PBMCs. Cells were then incubated for 5 h. For cytotoxic assays, IL-15-pretreated PBMCs were incubated for 5 h with K562 target cells at a 1:5 ratio. For each stimulation, anti-CD107a mAb (or its corresponding IgG1 isotype control) and Golgistop (BD Biosciences) were added to cultures in the last 5 h.

Acknowledgements: We gratefully acknowledge the technical assistance of M. Charron (Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Site de Poitiers, Poitiers). The authors are especially indebted to E. Schneider and J. Arsham (American translator, CHU de Poitiers) for critically reviewing the manuscript. We thank Image UP (University de Poitiers) flow cytometry core facilities. This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest (Comités départementaux, de la Charente, de la Charente-Maritime, des Deux-Sèvres et de la Vienne), ARIM-PC (Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes), Sport & Collection, INCa -DGOS - 8658, and Ministère de la Recherche.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Lee, Y. J., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A., Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends Immunol.* 2011. 32: 50–56.
- Verykokakis, M., Boos, M. D., Bendelac, A. and Kee, B. L., SAP protein-dependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(+) T cells with innate lymphocyte characteristics. *Immunity* 2010. 33: 203–215.
- Weinreich, M. A., Odumade, O. A., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A., T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 2010. 11: 709–716.
- Andreotti, A. H., Schwartzberg, P. L., Joseph, R. E. and Berg, L. J., T-Cell signaling regulated by the Tec family kinase, Itk. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. 2: a002287. doi:10.1101/cshperspect.a002287.
- Akue, A. D., Lee, J.-Y. and Jameson, S. C., Derivation and maintenance of virtual memory CD8 T cells. *J. Immunol.* 2012. 188: 2516–2523.
- Lee, J.-Y., Hamilton, S. E., Akue, A. D., Hogquist, K. A. and Jameson, S. C., Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013. 110: 13498–13503.
- Hu, J., Sahu, N., Walsh, E. and August, A., Memory phenotype CD8+ T cells with innate function selectively develop in the absence of active Itk. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: 2892–2899.
- Haluszczak, C., Akue, A. D., Hamilton, S. E., Johnson, L. D. S., Pujanowski, L., Teodorovic, L., Jameson, S. C. et al., The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J. Exp. Med.* 2009. 206: 435–448.
- Björkström, N. K., Béziat, V., Cichocki, F., Liu, L. L., Levine, J., Larsson, S., Koup, R. A. et al., CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. *Blood* 2012. 120: 3455–3465.
- Huard, B. and Karlsson, L., A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur. J. Immunol.* 2000. 30: 1665–1675.
- Veiken, L. T. van der, Campelo, M. D., Hoorn, M. A. W. G van der, Hagedoorn, R. S., Egmond, H. M. E. van, Bergen, J. van, Willemze, R. et al., Functional analysis of killer Ig-like receptor-expressing cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2009. 182: 92–101. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.92.
- Fehniger, T. A., Cai, S. F., Cao, X., Bredemeyer, A. J., Presti, R. M., French, A. R. and Ley, T. J., Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* 2007. 26: 798–811.
- Prlic, M., Blazar, B. R., Farrar, M. A. and Jameson, S. C., In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. *J. Exp. Med.* 2003. 197: 967–976.
- Ranson, T., Vossenrich C. A. J., Corcuff, E., Richard, O., Müller, W. and Santo, J. P. D., IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* 2003. 101: 4887–4893.
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. and Lugli, E., The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 2013. 43: 2797–2809.
- Warren, H. S., Rana, P. M., Rieger, D. T., Hewitt, K. A., Dahlstrom, J. E. and Kent, A. L., CD8 T cells expressing killer Ig-like receptors and NKG2A are present in cord blood and express a more naïve phenotype than their counterparts in adult blood. *J. Leukoc. Biol.* 2006. 79: 1252–1259.
- Min, H. S., Lee, Y. J., Jeon, Y. K., Kim, E. J., Kang, B. H., Jung, K. C., Chang, C.-H. et al., MHC class II-restricted interaction between thymocytes plays an essential role in the production of innate CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2011. 186: 5749–5757.
- Prince, A. L., Kraus, Z., Carty, S. A., Ng, C., Yin, C. C., Jordan, M. S., Schwartzberg, P. L. et al., Development of innate CD4+ and CD8+ T cells in Itk-deficient mice is regulated by distinct pathways. *J. Immunol.* 2014. 193: 688–699.
- Huang, W., Huang, F., Kannan, A. K., Hu, J. and August, A., ITK tunes IL-4-induced development of innate memory CD8+ T cells in a γ 8 T and invariant NKT cell-independent manner. *J. Leukoc. Biol.* 2014. 96: 55–63.

- 20 Berzins, S. P., Smyth, M. J. and Baxter, A. G., Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011. **11**: 131–142.
- 21 Fujii, S., Shimizu, K., Okamoto, Y., Kunii, N., Nakayama, T., Motohashi, S. and Taniguchi, M., NKT Cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front. Immunol.* 2013. **4**: 409. doi: 10.3389.
- 22 Shimizu, K., Kurosawa, Y., Taniguchi, M., Steinman, R. M. and Fujii, S.-i., Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with -galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2007. **204**: 2641–2653.
- 23 Tyznik, A. J., Verma, S., Wang, Q., Kronenberg, M. and Benedict, C. A., Distinct requirements for activation of NKT and NK cells during viral infection. *J. Immunol.* 2014. **192**: 3676–3685.
- 24 Rossignol, A., Levescot, A., Jacomet, F., Robin, A., Basbous, S., Giraud, C., Roy, L. et al. Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur. J. Immunol.* 2012. **42**: 1870–1875.

Abbreviations: CBMC: cord blood mononuclear cell · KIR: killer cell Ig-like receptor · Eomes: eomesodermin · PLZF: promyelocytic leukemia zinc finger protein · T-bet: T-box transcription factor · T_{EMRA}: terminally differentiated effector memory

Full correspondence: Dr. Jean-Marc Gombert, U1082 INSERM, Pôle Biologie Santé 1, rue Georges Bonnet BP 633, 86022 Poitiers, France
Fax: +33-1-49-58-33-23
e-mail: jean-marc.gombert@chu-poitiers.fr

See accompanying Commentary:
<http://dx.doi.org/10.1002/eji.201545761>

Received: 31/1/2015
Revised: 25/3/2015
Accepted: 20/4/2015
Accepted article online: 22/4/2015

Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients

Alexis Rossignol^{*1,2}, Anaïs Levescot^{*1,3}, Florence Jacomet^{1,2,4,5},
Auréli Robin⁶, Sara Basbous^{1,2}, Christine Giraud^{1,2,5,7}, Lydia Roy^{2,5,8,9},
François Guilhot^{1,2,5,8,9}, Ali G. Turhan^{1,2,5,10}, Anne Barra^{**1,2,4,5},
André Herbelin^{**1,3} and Jean-Marc Gombert^{**1,2,4,5}

¹ INSERM UMR S935, Poitiers and Villejuif, France

² Université de Poitiers, Poitiers, France

³ Université Paris-Sud XI, Orsay, France

⁴ Service d'Immunologie et Inflammation, Poitiers, France

⁵ CHU de Poitiers, Poitiers, France

⁶ INSERM UMR S1082, Poitiers, France

⁷ Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique Site de Poitiers, Poitiers, France

⁸ Service d'Oncologie Hématologique et Thérapie Cellulaire, Poitiers, France

⁹ Centre d'investigation clinique INSERM-P-802, Poitiers, France

¹⁰ Service d'Hématologie et d'Oncologie Biologique, Poitiers, France

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal hematopoietic stem-cell malignancy characterized by the presence of the chimeric BCR-ABL oncoprotein with deregulated tyrosine-kinase (TK) activity. Although conventional T cells are acknowledged as important players in the control of CML, a possible modification of invariant NKT (iNKT) cells, known for their antitumoral activity, has not been established as yet. Here, we showed that the expression of perforin, CD95L, and promyelocytic leukemia zinc finger, a transcription factor required for maintenance of iNKT cell functions, was reduced or suppressed in CML patients at diagnosis, as compared with healthy individuals. The proliferation rate of blood iNKT cells in response to their cognate ligand was likewise diminished. These functional deficiencies were corrected in patients having achieved complete cytogenetic remission following TK inhibitor or IFN- α therapy. iNKT cells from CML patients in the chronic phase did not display increased TK activity, which argued against a direct autonomous action of BCR-ABL. Instead, we found that their anergic status originated from both intrinsic and APC-dependent dysfunctions. Our data demonstrate that chronic phase CML is associated with functional deficiencies of iNKT cells that are restored upon remission. These results suggest a possible contribution to disease control by TK inhibitor therapies.

Keywords: Anergy · Chronic myeloid leukemia · iNKT cells · Tyrosine-kinase inhibitors



Supporting Information available online

Correspondence: Dr. Jean-Marc Gombert
e-mail: j.m.gombert@chu-poitiers.fr

*These authors contributed equally to this work.

**These senior authors contributed equally to this work.

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a well-characterized myeloproliferative disorder, initiated by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph) generating the BCR-ABL oncoprotein, which gives rise to deregulated tyrosine-kinase (TK) activity in all leukemic cells [1]. For many years, allogeneic stem cell transplantation has been regarded as the standard curative therapy and was offered front line in patients in whom an HLA-compatible donor was available, with IFN- α therapy as a possible alternative [1]. However, based on the results of the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) trial, imatinib mesylate (IM), a competitive inhibitor of the BCR-ABL TK activity, is currently used as a first line therapy of CML [2, 3].

A critical role of the immune system in the control of CML [4–8] is supported by several reports, even though the mechanisms of this antileukemic response are poorly understood. Invariant NKT (iNKT) cells constitute a distinct lymphocyte population sharing a conserved semi-restricted TCR that recognizes glycolipidic antigens in the context of CD1d [9], with the unusual ability to rapidly secrete both Th1 and Th2 cytokines upon primary stimulation, together with a complete cytotoxic arsenal. The transcription factor promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) directs the effector program of the iNKT cell lineage [10, 11] which is believed to play a key role in the regulation of various immune responses, including antitumor responses in experimental mouse models [12–15], as well as in human solid tumors [16–18] and hematopoietic malignancies [19, 20]. However, although the role of conventional T cells, particularly their tumor Ag-specific cytotoxic subset [4, 7, 8], in the control of CML has been largely documented, the implication of iNKT cells has not been clearly established and has only been investigated in a single study comprising exclusively CML patients having undergone treatment with IM [21].

Here, we addressed this issue by comparing frequencies, perforin, CD95L, and PLZF expression, as well as proliferative responses between blood iNKT cells from healthy donors (HDs) and CML patients, either at diagnosis or after induction of complete remission (CR) by IM or IFN- α therapy. Based on our results, it can be concluded that iNKT cell functions are impaired during chronic phase (CP) CML, but return to normal after therapy.

Results and discussion

Functional deficiencies of iNKT cells in CML-CP patients are reversed by IM or IFN- α therapy

Significantly reduced blood iNKT cell frequencies have been reported in several forms of cancer, including hematologic malignancies [16–20]. Such a decrease in cell counts could not be evidenced in CML patients as assessed by flow cytometry analysis of PBMCs (Supporting Information Fig. 1), either in CP at the time of diagnosis or after molecular remission induced by IM (Supporting Information Fig. 2A). iNKT cells from CML-CP patients were both CD4⁺ and CD4⁻ at ratios similar to those found in HDs (Support-

ing Information Fig. 2B and C). Only CML patients who achieved CR upon treatment with IFN- α had less iNKT cells than normal with a higher proportion of CD4⁺ T cells.

Knowing that iNKT cells are endowed with cytolytic activity enabling them to exert an antileukemic effect [19, 20], we examined whether their expression of perforin and CD95L was modified in CML patients relative to HDs (Fig. 1A and B, Supporting Information Fig. 3). This was clearly the case, since these molecules were either undetectable or expressed at very low levels during disease, while they were present in almost 40% iNKT cells in HDs, as measured by intracytoplasmic staining. However, in patients

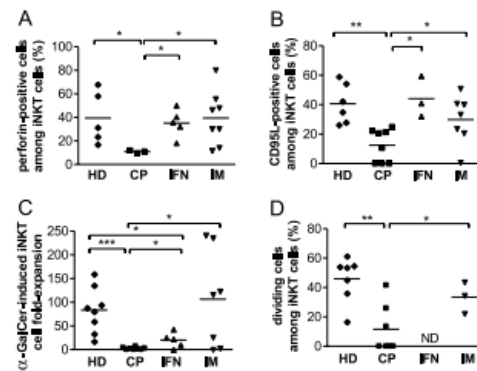


Figure 1. Expression of perforin and CD95L, and proliferation in iNKT cells from CML patients and HDs. (A) PBMCs from CML-CP patients, IM- or IFN- α -treated CML-CR patients, or HDs were cultured for 14 days in the presence of IL-2 and IL-15. Cells were membrane-labeled with anti-V α 24-PE mAb and α -GalCer-loaded CD1d-TT-allophycocyanin, permeabilized with Cytofix/Cytoperm™ kit, and stained with anti-perforin FITC. Intracellular expression of perforin was analyzed after gating on the V α 24⁺ α -GalCer-loaded CD1d TT⁺ cells. The frequency of perforin-expressing iNKT cells in CML-CP patients (10.9 ± 0.7%, n = 3), HDs (39.4 ± 10%, n = 5), IM-treated (39.4 ± 8%, n = 8), and IFN- α -treated (35.2 ± 5.2%, n = 5) CML-CR patients was determined. (B) PBMCs from CML-CP patients, IM- or IFN- α -treated CML-CR patients, or HDs were membrane-labeled with anti-CD3-PerCPy5.5 and anti-iNKT-PE 6B11 clonotype, permeabilized with Cytofix/Cytoperm™ kit, and stained with anti-CD95L-allophycocyanin. Intracellular expression of CD95L was analyzed after gating on the CD3⁺6B11⁺ cells in CML-CP patients (12.5 ± 4%, n = 8), HDs (40.7 ± 6%, n = 6), IM-treated (29.9 ± 6%, n = 6) and IFN- α -treated (44.1 ± 8%, n = 3) CML-CR patients. (C, D) A total of 2 × 10⁵ PBMCs from CML-CP patients, IM- or IFN- α -treated CML-CR patients, or HDs were incubated with IL-2 and IL-15 in the presence or absence of α -GalCer. Fold expansion was calculated by dividing the number of V α 24⁺ α -GalCer-loaded CD1d TT⁺ cells recovered from a 14-day culture with α -GalCer, by their number recovered from cultures without ligand. In some experiments, to define dividing cells, PBMCs were stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), prior to a 7-day culture with IL-2 + IL-15 in the presence or absence of α -GalCer. (C) Fold expansion of iNKT (V α 24⁺ α -GalCer-loaded CD1d TT⁺) cells in CML-CP patients (2.1 ± 0.9, n = 8), HDs (83.1 ± 16.9, n = 8), IM-treated (106.3 ± 38.9, n = 7) or IFN- α -treated patients (20.0 ± 7.3, n = 5). (D) Proliferation was assessed via CFSE staining. Expression of CFSE was analyzed after gating on the CD3⁺6B11⁺ cells. The frequency of dividing cells among iNKT cells in CML-CP patients (11.6 ± 6%, n = 7), HDs (45.9 ± 6%, n = 7), and IM-treated CML-CR patients (33.5 ± 6%, n = 3). Data are shown as mean ± SEM from three to four separate experiments. Each symbol represents data from one donor/patient *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Mann-Whitney nonparametric test. ND: not done.

having achieved CR following IM or IFN- α therapy we observed a remarkable reversal of this deficiency, back to proportions occurring in HDs.

Because iNKT cell proliferation is reportedly arrested in several malignant diseases [17–20], we addressed the question whether it is also the case in CML-CP patients. As shown in Fig. 1C and in Supporting Information Fig. 4A, iNKT cells from CML-CP patients proliferated much less in response to their cognate ligand α -GalCer than their counterpart from HDs (mean \pm SEM: 2.2 ± 0.8 -fold versus 83.1 ± 16.9 -fold, respectively). This result was in accordance with the reduced proportion of cycling cells among the CML-CP iNKT cell population in the same culture conditions (Fig. 1D, and Supporting Information Fig. 4B). Once again, the defect was corrected in CML-CR patients having received IM and IFN- α therapy, in which iNKT cells increased 100-fold or 20-fold, respectively, upon exposure to α -GalCer. In contrast with iNKT cells, conventional T cells conserved their proliferative potential in CML-CP patients. Indeed, V β 2⁺ polyclonal MHC class II-restricted T cells responded normally to the super-antigen TSST1 (Supporting Information Fig. 5A and B), and PBMCs stimulation with anti-CD3/CD28 beads revealed also no significant difference between CML-CP patients and HDs in terms of cell growth (Supporting information Fig. 5C).

The anergic status of iNKT cells is partially reversed by IM in vitro implicating BCR-ABL TK activity

The fact that iNKT cells from CML patients emerge from their anergic status after IM therapy suggests that BCR-ABL activity contributes to the functional defect of iNKT cells. In accordance with this notion, in vitro culture of PBMCs with the TK inhibitor IM led to a significant improvement of the proliferation rate of iNKT cells from CML-CP patients with a 2- to 50-fold increase induced by IM (Fig. 2A). The fact that in the same experimental set up the number of iNKT cells recovered remained virtually unchanged in HDs reflects the selective sensitivity of CP patients to IM. However, it should be noted that exposure to IM in vitro restored the proliferative capacity of iNKT cells from CML-CP patients only partially. This result, together with our demonstration that both IM therapy and IFN- α therapy reversed the anergic status of iNKT cells suggests the involvement of complex immunoregulatory mechanisms rather than the sole direct inhibition of BCR-ABL activity in hematopoietic cells. Consistent with this view, the expression of Ph chromosome in T cells is commonly considered a very rare event. Also, we found that TK activity assessed by cytometry analysis of intra-cytoplasmic phospho-tyrosine levels was modified neither in iNKT cells nor in T cells from CML-CP patients, relative to their counterpart from HDs, while it was clearly enhanced among the CD34⁺ myeloid progenitor subset (Fig. 2B and C). Moreover, in vitro treatment with IM had no effect on phospho-tyrosine MFI in iNKT cells and T cells from both CML-CP and HDs, while it led to a substantial decrease in CD34⁺ cells from CML-CP patients. These results argue against a direct autonomous action of BCR-ABL in iNKT cells.

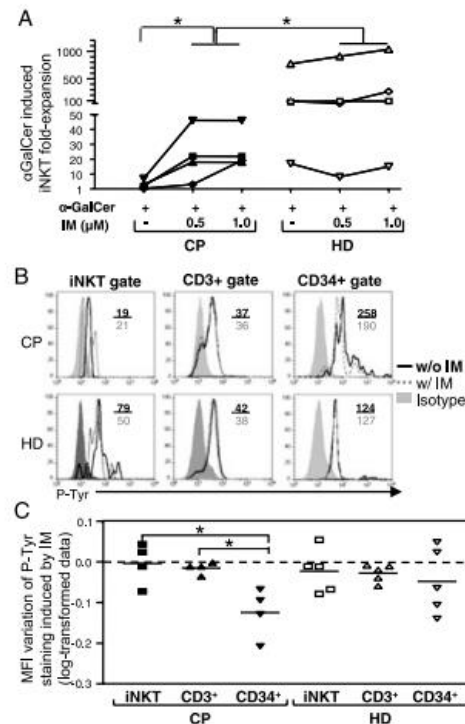


Figure 2. BCR-ABL TK activity in iNKT cells and CD34⁺ cells: influence of IM treatment in vitro. (A) PBMCs from CML-CP patients ($n = 4$) or HDs ($n = 4$) were cultured, as described in Fig. 1, in the presence or absence of IM (0.5 or 1 μ M). iNKT cell fold expansion for each condition was calculated as described in Fig. 1 and plotted on the graph for each individual donor. * $p = 0.05$ between CP and HDs. Mann-Whitney nonparametric test. (B) PBMCs from CML-CP patients and HDs were cultured for 20 h in the presence or absence of IM (1 μ M). Cells were membrane-labeled with anti-CD3-PE-Cy5 and α -GalCer-loaded CD1d TT-allophycocyanin, anti-V α 24-PE and α -GalCer-loaded CD1d TT-allophycocyanin, or anti-CD34-PE, permeabilized with Cytofix/CytopermTM kit, and stained with anti-P-Tyr mAb (mouse IgG2b) and a FITC polyclonal Ab anti-mouse IgG2b. Analysis was performed by flow cytometry gating on V α 24⁺ α -GalCer-loaded CD1d TT-CD3⁺ cells, V α 24⁺ α -GalCer-loaded CD1d TT⁺ cells or CD34⁺ cells. One representative result out of four CML-CP patients or five HDs is shown. Numbers indicate P-Tyr MFI values with IM or without IM (bold numbers). (C) PBMCs from CML-CP patients ($n = 4$) or HDs ($n = 5$) were cultured in the presence or absence of IM (1 μ M) and tyrosine phosphorylation (P-Tyr) was analyzed after gating on iNKT cells, CD3⁺ cells and CD34⁺ cells. MFI ratio between IM-treated and non-treated conditions are log-transformed and plotted for each individual sample; horizontal bars represent the mean. * $p < 0.05$. Student t-test. Data are representative of four to five experiments.

Anergy is associated with intrinsic and APC-dependent functional deficiencies of iNKT cells during CML-CP

The anergic status of iNKT cells during CP CML might be an indirect effect resulting from BCR-ABL expression in some APCs required for activation. Indeed, several functional defects

(including inefficient actin polymerization and antigen processing) have previously been reported in myeloid DCs from CML patients [22]. Consistent with this hypothesis, we found that α -GalCer-loaded ex vivo-generated monocyte-derived DCs obtained from CML-CP patients were unable to ensure optimal expansion of a HD-derived iNKT cell line, conversely to their counterpart from HDs (Supporting Information Fig. 6). These findings along with the fact that in vitro exposure to IM did not completely restore normal iNKT cell proliferation led us to assume that total reversal of the anergic state requires activation and/or maturation steps for which APCs are critical. Furthermore, we showed that intrinsic modifications underlie the BCR-ABL-dependent anergy of iNKT

cells from CML-CP patients (Fig. 3, and Supporting Information Fig. 7). Indeed, these cells proliferated less in response to anti-CD3/CD28 beads, which provide TCR-dependent stimulation that bypasses APCs, than their HDs counterpart. In the same line of evidence, PLZF, a transcription factor requisite for the differentiation and maintenance of functional iNKT cells failed to be expressed in cells from CML-CP patients (Fig. 3B). Lastly, in accordance with recent studies in mice showing that PLZF-deficient iNKT cells do not acquire the capacity to secrete IL-4 [10, 11], we observed the same modification in iNKT cells from CML-CP patients upon stimulation with PMA/ionomycin (Fig. 3C). These findings are consistent with the observation that the proliferative response of iNKT cells from CML-CP patients could not be restored in vitro by adding APCs from HDs (data not shown). Importantly, proliferation in response to anti-CD3/CD28 beads (Fig. 3A) as well as expression of PLZF and IL-4 (Fig. 3B and C) returned to normal when iNKT cells were recovered from patients who had achieved CR after IM or IFN- α therapy, confirming that the functional impairment during CP CML is reversible.

Taken together, our results show that iNKT cells in CML-CP patients have specifically lost their ability to proliferate in response to their cognate ligand and to exert their cytolytic functions through perforin and CD95L expression. Further investigations are required to elucidate the exact mechanism accounting for the effects of IM and IFN- α on these parameters. Nonetheless, our results suggest that the dysfunctions of iNKT cells are partly caused by defective APCs that are probably rescued by IM or IFN- α therapy, a view that is in agreement with a previous study reporting that ex vivo-generated monocyte-derived DCs from IM-treated CML-CP patients can activate iNKT cell lines with similar efficiency than their HDs counterpart [21]. As α -GalCer has already been used in clinical trials [23], our findings lead to propose that combination of IM with an immunotherapy using α -GalCer-pulsed auto DCs might become a new and useful strategy for targeting iNKT cells to restore their functions in CML-CP patients. However, the possibility that IM and/or IFN- α act(s) in part by enabling iNKT cells to exert their antileukemic effects should be investigated before using their ligands as a therapeutic strategy in CML.

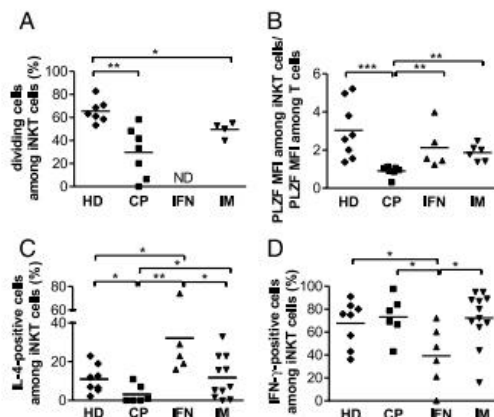


Figure 3. Analysis of TCR- and non-APC-dependent proliferation of iNKT cells, as well as their PLZF and IL-4 expression in CML patients and HDs. (A) A total of 2×10^5 PBMCs from CML-CP patient, IM-treated CML-CR patients, or HDs were stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) and then incubated with anti-CD3/CD28 beads for 7 days. Expression of CFSE was analyzed after gating on CD3⁺ 6B11⁺ cells. The frequency of dividing cells among iNKT cells was determined for CML-CP patients ($29.7 \pm 8\%$, $n = 7$), HDs ($65.5 \pm 4\%$, $n = 7$), and IM-treated CML-CR patients ($49.6 \pm 3\%$, $n = 4$). (B) PBMCs from CML-CP patients, IM- or IFN- α -treated CML-CR patients, or HDs were membrane-labeled with anti-CD3-PerCP-Cy5 and anti-iNKT-PE 6B11 clonotype, fixed, permeabilized, and stained with anti-PLZF mAb as previously described [10]. PLZF expression was analyzed after gating on CD3⁺ 6B11⁺ cells. iNKT cell PLZF MFI/total T-cell PLZF MFI ratio for each CML-CP patient (0.89 ± 0.1 , $n = 7$), IM-treated (1.86 ± 0.2 , $n = 6$) or IFN- α -treated (2.12 ± 0.5 , $n = 5$) CML-CR patient, or HDs (3.03 ± 0.5 , $n = 8$). (C, D) PBMCs from CML-CP patients, IM- or IFN- α -treated CML-CR patients, or HDs were stimulated for 5 h with PMA/ionomycin in the presence of monensin. Cells were membrane-labeled with anti-V α 24-PE mAb (or V α 24-FITC mAb) and α -GalCer-loaded CD1d1 TT-allophycocyanin, permeabilized with Cytotfix/Cytoperm™ kit and stained with anti-IFN- γ -FITC (or anti-IL-4-PE, respectively). (C) Intracellular expression of IFN- γ and IL-4 was analyzed after gating on V α 24⁺ α -GalCer-loaded CD1d1 TT⁺ cells. The frequency (%) of IL-4-expressing cells among iNKT cells was determined for CML-CP patients ($3.15 \pm 2\%$, $n = 6$), HDs ($11.0 \pm 3\%$, $n = 8$), IM-treated ($11.8 \pm 3\%$, $n = 11$), and IFN- α -treated ($32.2 \pm 11\%$, $n = 6$) CML-CR patients. (D) IFN- γ expressing cell frequencies among iNKT cells were determined for HDs ($67.6 \pm 7\%$, $n = 8$), CML-CP patients ($73.2 \pm 8\%$, $n = 6$), IFN- α -treated patients ($39.2 \pm 11\%$, $n = 6$), and IM-treated patients ($72.3 \pm 7\%$, $n = 12$). Each symbol represents data from one donor/patient; horizontal bars represent the mean. Values indicated are mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Mann-Whitney nonparametric test. ND: not done.

Concluding remarks

The present study provides evidence that CP CML is associated with an acquired but potentially reversible defect in iNKT cells. Given the critical role of this innate cell population in tumor surveillance, our data reveal a new mechanism allowing leukemic cells to escape from an anti-CML immune response, and support the notion that iNKT cells play a role in controlling the disease in patients undergoing IM or IFN- α therapy.

Materials and methods

Patients

CML patients treated in the Oncology-Hematology and Cell Therapy Department and INSERM CIC-P-802 were included in this

study. Patients were divided into three groups according to their treatment and to their clinical status as follows: (i) 22 untreated patients studied at diagnosis (100% Ph⁺ mitosis in cytogenetic analysis); (ii) 23 patients currently treated with IM and who have achieved either complete cytogenetic remission (0% Ph⁺ mitosis in cytogenetic analysis of at least 20 mitosis) and major molecular response (BCR-ABL/ABL ratio at 0.1% in International Scale or the status of undetectable BCR-ABL in peripheral blood by RT-qPCR (undetectable molecular residual disease, UMRD)). These cytogenetic and molecular responses are referred to as CR, and (iii) 14 patients who were initially treated with IFN- α and developed a sustained CR maintained at least 3 years after treatment discontinuation. The 24 HDs were volunteers from the Pôle Biologie Santé (Poitiers, France). An informed consent was obtained from patients and HDs. The study was approved by the local Institutional Review Board (CHU La Milétrie). Blood samples were collected on heparin and PBMCs were isolated and cultured as previously described [24].

Reagents

A total of 10 ng/mL IL-2 and 10 ng/mL IL-15 (R&D systems, Abingdon, UK), 100 ng/mL α -GalCer (Kirin Brewery, Gunma, Japan), 10 ng/mL TSST1 superantigen (Sigma-Aldrich, Lyon, France), and 0.5 or 1 μ M IM (GlivecTM, Novartis, Rueil-Malmaison, France) were used in this study. Anti-IFN- γ -FITC, anti-IL-4-PE, anti-perforin-FITC, anti-CD34-PE, anti-CD3-PE-Cy5.5, anti-CD3-PerCP-Cy5.5, anti-CD4-FITC mAb, anti-iNKT-PE 6B11 clone, and anti-CD95L-allophycocyanin mAb were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France) and Miltenyi Biotec SAS (Paris, France), respectively. Anti-CD8-PE-Cy7 was purchased from eBioscience (Paris, France). Anti-V α 24-FITC, anti-V β 2-FITC and anti-V α 24-PE, and anti-phosphotyrosine mAb (mouse IgG2b) and FITC polyclonal Ab anti-mouse IgG2b were purchased from Beckman Coulter (Villepinte, France) and Southern Biotechnology (Birmingham, AL), respectively. Anti-PLZF mAb (clone D-9, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was coupled in our laboratory with Alexa Fluor 647 with a kit from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Allophycocyanin-conjugated CD1d-tetramer loaded with α -GalCer (α -GalCer-loaded CD1d TT-allophycocyanin) was provided by the NIH tetramer facility (Atlanta, GA, USA).

Flow cytometry analysis

Cells were analyzed by four-color flow cytometry (FACScaliburTM and CellQuestTM software, BD Biosciences) or six-color flow cytometry (FacsCanto IITM and FacsDivaTM software, BD Biosciences), and data were reanalyzed with FlowJoTM (Treestar, Ashland, OR). For in vitro experiments, dead cells were excluded by propidium iodide staining. At least 105 viable cell events were acquired in the peripheral blood lymphocyte gate (assessed by forward and side scatter parameters). Positive staining for each

marker was determined by comparison to appropriate isotype-matched negative controls or nonloaded CD1d-TT.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the technical assistance of S. Noel. The authors are especially indebted to Elke Schneider and Michael Melkus for critically reviewing the manuscript and thank the NIH tetramer core facility for the α -GalCer-loaded CD1d-TT. Financial support came from INSERM, CHU de Poitiers, Université Paris Sud 11 (AAP « Attractivité » 2011), Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer (Comité de la Vienne et Comité du Val-de-Marne), ARI-PC (Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes), and Ministère de la Recherche.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Goldman, J. M. and Melo, J. V., Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* 2003. 349: 1451–1464.
- O'Brien, S. G., Guilhot, F., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J. J., Fischer, T. et al., Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003. 348: 994–1004.
- Druker, B., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W. et al., Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukaemia. *N. Engl. J. Med.* 2006. 355: 2408–2417.
- Moldrem, J. J., Lee, P. P., Wang, C., Fello, K., Kantarjian, H. M., Champlin, R. E. and Davis, M. M., Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* 2000. 6: 1018–1023.
- Sacchi, S., Kantarjian, H., O'Brien, S. G., Cohen, F. R., Pierce, S. and Talpaz, M., Immune-mediated and unusual complications during interferon alfa therapy in chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Oncol.* 1995. 13: 2401–2407.
- Steegmann, J. L., Requena, M. J., Martín-Regueira, P., De La Cámara, R., Casado, F., Salvanés, F. R. and Fernández Rañada, J. M., High incidence of autoimmune alterations in chronic myeloid leukemia patients treated with interferon-alpha. *Am. J. Hematol.* 2003. 272: 170–176.
- Moldrem, J. J., Clave, E., Jiang, Y. Z., Mavroudis, D., Raptis, A., Hensel, N., Agarwala, V. et al., Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia colony-forming units. *Blood* 1997. 90: 2529–2534.
- Nieda, M., Nicol, A., Kikuchi, A., Kashiwase, K., Taylor, K., Suzuki, K., Tadokoro, K. et al., Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8⁺ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998. 91: 977–983.
- Bendelac, A., Savage, P. B. and Teyton, L., The biology of NKT cells. *Ann. Rev. Immunol.* 2007. 25: 297–336.

- 10 Savage, A. K., Constantinides, M. G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O. et al., The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 2008. **29**: 391–403.
- 11 Kovalovsky, D., Uche, O. U., Eladad, S., Hobbs, R. M., Yi, W., Alonzo, E., Chua, K. et al., The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat. Immunol.* 2008. **9**: 1055–1064.
- 12 Smyth, M. J., Crowe, N. Y., Pellicci, D. G., Kyriakopoulos, K., Kelly, J. M., Takeda, K., Yagita, H. et al., Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* 2002. **99**: 1259–1266.
- 13 Nakui, M., Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Wakabe, K., Yahata, T., Kitamura, H. et al., Potentiation of antitumor effect of NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide by combination with IL-12 on lung metastasis of malignant melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 2000. **18**: 147–153.
- 14 Crowe, N. Y., Smyth, M. J. and Godfrey, D. L., A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Exp. Med.* 2002. **196**: 119–127.
- 15 Morris, E. S., MacDonald, K. P., Rowe, V., Banovic, T., Kuns, R. D., Don, A. L., Bofinger, H. M. et al., NKT cell-dependent leukemia eradication following stem cell mobilization with potent G-CSF analogs. *J. Clin. Invest.* 2005. **115**: 3093–3103.
- 16 Tahir, S. M., Cheng, O., Shaulov, A., Kozuka, Y., Buble, G. J., Wilson, S. B., Balk, S. P. et al., Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J. Immunol.* 2001. **167**: 4046–4050.
- 17 Yanagisawa, K., Seino, K., Ishikawa, Y., Nozue, M., Todoroki, T. and Fukao, K., Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide. *J. Immunol.* 2002. **168**: 6494–6499.
- 18 Nowak, M., Arredouani, M. S., Tun-Kyi, A., Schmidt-Wolf, I., Sanda, M. G., Balk, S. P. and Exley, M. A., Defective NKT cell activation by CD1 d+ TRAMP prostate tumor cells is corrected by interleukin-12 with alpha-galactosyl-ceramide. *PLoS ONE* 2010. **5**: e11311.
- 19 Nieda, M., Nicol, A., Kozuka, Y., Kikuchi, A., Lapteva, N., Tanaka, Y., Tokunaga, K. et al., TRAIL expression by activated human CD4(+)V alpha 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2001. **97**: 2067–2074.
- 20 Dhodapkar, M. V., Geller, M. D., Chang, D. H., Shimizu, K., Fujii, S., Dhodapkar, K. M. and Krasovsky, J., A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. *J. Exp. Med.* 2003. **197**: 1667–1676.
- 21 Shimizu, K., Hidaka, M., Kadowaki, N., Makita, N., Konishi, N., Fujimoto, K., Uchiyama, T. et al., Evaluation of the function of human invariant NKT cells from cancer patients using alpha-galactosylceramide-loaded murine dendritic cells. *J. Immunol.* 2006. **177**: 3484–3492.
- 22 Dong, R., Cwynarski, K., Entwistle, A., Marelli-Berg, F., Dazzi, F., Simpson, E., Goldman, J. M. et al., Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* 2003. **101**: 3560–3567.
- 23 Nieda, M., Okai, M., Tazbirkova, A., Lin, H., Yamaura, A., Ide, K., Abraham, R. et al., Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 2004. **103**: 383–389.
- 24 Rossignol, A., Barra, A., Herbelin, A., Preud'homme, J. L. and Gombert, J. M., Freshly isolated Valpha24(+) CD4(+) invariant natural killer T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed B cells promote both IgG and IgE production. *Clin. Exp. Immunol.* 2007. **148**: 555–563.

Abbreviations: α -GalCer: galactosylceramide · CML: chronic myeloid leukemia · CP: chronic phase · CR: complete remission · HD: healthy donor · IM: imatinib mesylate · iNKT cell: invariant NKT cell · Ph: Philadelphia chromosome · PLZF: promyelocytic leukemia zinc finger protein · P-Tyr: phospho-tyrosine · TK: tyrosine-kinase · TT: tetramer

Full correspondence: Dr. Jean-Marc Gombert, UMR INSERM S935, Pôle Biologie Santé, 1, rue George Bonnet BP633 86022 Poitiers Cedex, France
 Fax: +33-549443834
 e-mail: j.m.gombert@chu-poitiers.fr

Received: 16/8/2011
 Revised: 28/2/2012
 Accepted: 11/4/2012
 Accepted article online: 14/5/2012

ANNEXE 3 : BASBOUS ET AL., J PATHOL 2016

Journal of Pathology

J Pathol 2016; 240: 262–268

Published online 29 September 2016 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/path.4779

BRIEF DEFINITIVE REPORT

The Rho–ROCK pathway as a new pathological mechanism of innate immune subversion in chronic myeloid leukaemia

Sara Basbous,^{1,2} Anaïs Levescot,^{1†} Nathalie Piccirilli,³ Françoise Brizard,^{3,4} François Guilhot,^{2,3,4,5} Lydia Roy,⁵ Nicolas Bourmeyster,⁶ Jean-Marc Gombert^{1,2,3,7} and André Herbelin^{1,2,3*}

¹ INSERM U1082, Poitiers, France

² Université de Poitiers, Poitiers, France

³ CHU de Poitiers, Poitiers, France

⁴ Service d'Hématologie et d'Oncologie Biologique, Poitiers, France

⁵ INSERM-CIC 1402, Poitiers, France

⁶ Laboratoire STIM CNRS-ERL7368, Poitiers, France

⁷ Service d'Immunologie et Inflammation, Poitiers, France

*Correspondence to: A Herbelin, Inserm 1082, Pôle de Biologie Santé, 1, rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers, France.

E-mail: andre.herbelin@inserm.fr

†Present address: Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital, Division of Rheumatology, Immunology and Allergy, Boston, MA, USA

Abstract

CD1d-restricted invariant natural killer T (iNKT) cells are believed to play a key role in cancer immune surveillance, and are functionally deficient in patients with chronic myeloid leukaemia (CML). Herein, we have hypothesized that this defect might originate from BCR-ABL-dependent dysfunctions in myeloid dendritic cells (mDCs). Indeed, flow cytometry and confocal microscopy revealed that cell surface expression of CD1d was downregulated in CML mDCs, relative to healthy donor (HD) controls. The decreased cell surface display of CD1d could not be ascribed to defective mDC differentiation, as attested by normal expression of HLA-DR and the CD86 maturation marker. On the other hand, reduced membrane expression was not associated with decreased intracytoplasmic levels of CD1d or its mRNA transcripts, consistent with intracellular retention. *In vitro* treatment of CML mDCs with the Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 partially restored both cell surface CD1d expression and CD1d-mediated antigen presentation, whereas it had no effect on HD mDCs. An inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase (TK), imatinib mesylate (IM), had no such activity. Similar recovery of CD1d expression occurred with fasudil, another ROCK inhibitor that is commonly used in clinical trials. Our data support the conclusion that BCR-ABL-dependent ROCK, but not TK, is involved in CD1d downregulation. We propose that ROCK, which is most likely activated by the DH/PH domain of BCR-ABL, mediates iNKT-cell immune subversion in CML patients by downregulating CD1d expression on CML mDCs. Our study reveals the ROCK–mDC axis as a new potential target to restore immune surveillance in patients with CML, offering new therapeutic perspectives for CML treatment. Copyright © 2016 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: dendritic cells; CD1d; chronic myeloid leukaemia; Rho-associated protein kinase; iNKT cells

Received 11 March 2016; Revised 20 July 2016; Accepted 3 August 2016

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a myeloproliferative disorder initiated by the Philadelphia (Ph) chromosome generating the BCR-ABL oncoprotein, which gives rise to deregulated tyrosine kinase (TK) activity in leukaemic cells [1]. TK activity residing within the ABL gene of BCR-ABL is generally considered to be sufficient to induce malignant transformation, whereas the DH-PH domain of the BCR component contributes to disease progression by activating the Rho–Rho-associated protein kinase (ROCK) pathway, which is implicated in the control of leukaemia cell motility [2,3].

The ABL kinase inhibitor imatinib mesylate (IM) induces complete cytogenetic responses in >80% of newly diagnosed CML chronic-phase (CML-CP) patients [4]. However, this treatment does not eliminate all CML cells, and may fail because of clinical resistance, necessitating additional therapeutic strategies to eradicate all CML clones.

Several reports have supported a role of the immune system in the control of CML, even though the mechanisms of this anti-leukaemic response remain unclear. We recently demonstrated that the chronic phase of CML is associated with functional deficiencies of invariant natural killer T (iNKT) cells [5]. These innate-like T cells expressing a semi-invariant T-cell receptor (TCR)

Copyright © 2016 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org

J Pathol 2016; 240: 262–268
www.thejournalofpathology.com

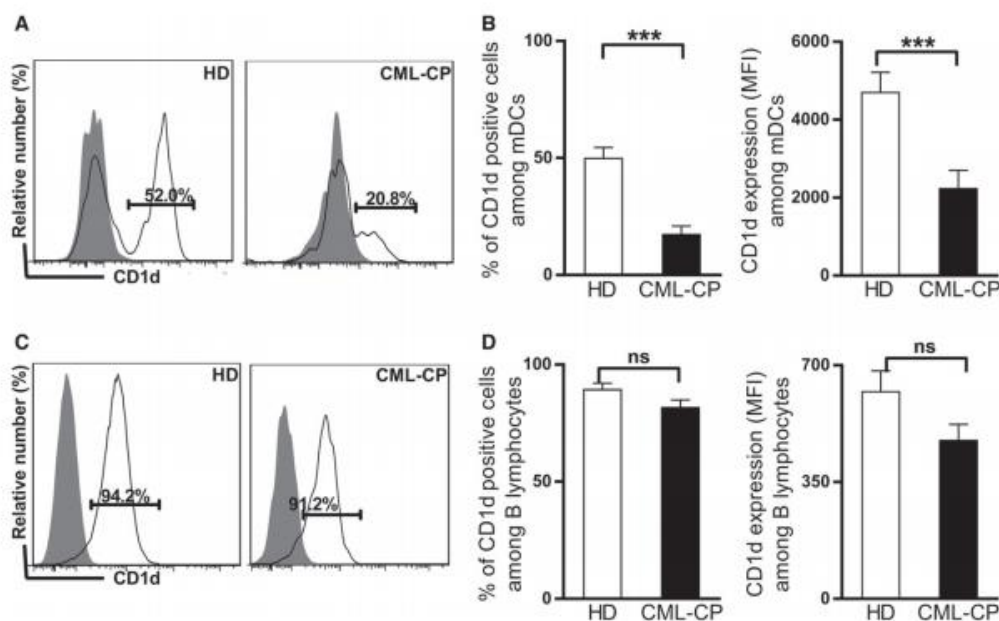


Figure 1. Surface CD1d expression by peripheral blood mDCs and B lymphocytes from CML-CP patients and HDs. Surface CD1d expression among PBMCs was analysed by flow cytometry after gating on mDCs (CD11c-positive) (A, B) or B cells (CD19-positive) (C, D) from HDs ($n = 17$ and $n = 6$ for mDCs and B cells, respectively) and CML-CP patients ($n = 28$ and $n = 6$ for mDCs and B cells, respectively). (A, C) A representative histogram is shown for each group of HDs and CML-CP patients. Numbers indicate percentages of CD1d-expressing cells. Filled histograms show isotype controls. (B, D) Frequency (%) (left panels) and MFI (right panels) values of CD1d-expressing cells among the population of interest of the cohort study are shown as means \pm standard errors of the mean (SEM) from four separate experiments. (B, D) Mann-Whitney non-parametric test. ns, not significant. *** $p < 0.001$.

that recognizes glycolipid antigens presented by the evolutionarily conserved CD1d molecule are believed to play a key role in cancer immune surveillance [6].

Having shown that iNKT cells from CML-CP patients do not express the Ph chromosome [5], we investigated whether their anergic state resulted from BCR-ABL-dependent dysfunctions in myeloid dendritic cells (mDCs). We found that mDCs from CML-CP patients downregulated their CD1d cell surface expression, thereby impairing CD1d presentation to iNKT cells.

Materials and methods

Patient and control donors

All patients and volunteers gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki for participation in the study, which was approved by the Inserm CIC-1402 scientific committee (Poitiers, France).

Flow cytometric analysis

Cells were stained as previously described [5,7,8], and analysed by six-colour flow cytometry (FACSVerse

and FACS software; BD Biosciences); data were reanalysed with FlowJo Software (Treestar).

In vitro differentiation of mature mDCs from blood monocytes and treatment with inhibitors

Mature mDCs derived *in vitro* from blood monocytes (Mo-DCs) were generated from magnetic activated cell sorting-enriched CD14 cell fractions by incubation at 8×10^5 cells/well into 96-well round U-bottomed culture plates with interleukin (IL)-4 (10 ng/ml) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (25 ng/ml) for 3 days. The cells were differentiated in the presence of 1 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) for the final 18 h of culture in the presence of a ROCK inhibitor (Y-27632 or fasudil at 20 μ M) and/or IM (1 μ M) or medium alone.

Detailed methods are available in Supplementary materials and methods.

Results and discussion

We postulated that BCR-ABL-dependent dysfunctions in mDCs might account for the anergic state of CML-CP

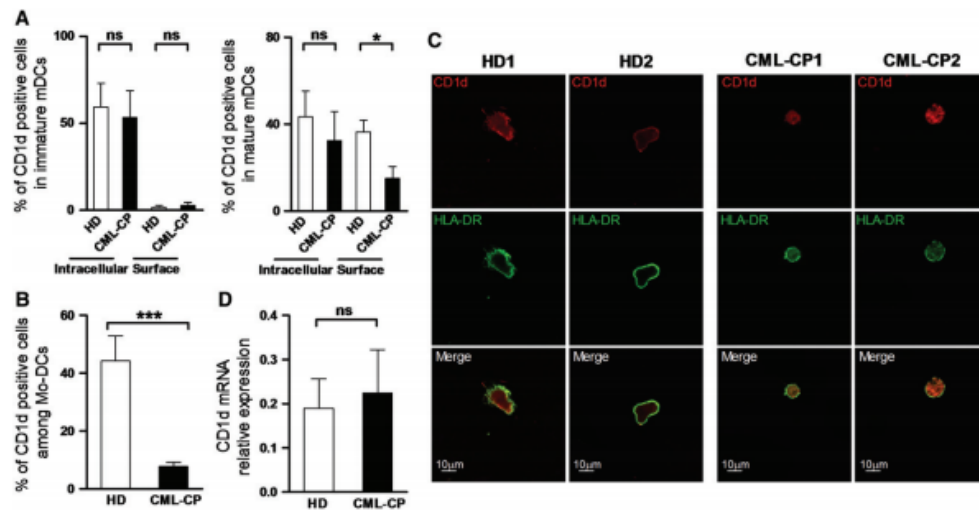


Figure 2. Cellular localization of CD1d molecules in mDCs from CML-CP patients and HDs. (A) The frequency of cells expressing intracytoplasmic or surface CD1d was measured by flow cytometry among PBMCs after gating on immature (CD11c-positive, HLA-DR-negative) (left panel) or mature (CD11c-positive, HLA-DR-positive) mDCs (right panel) from HDs ($n=4$) and CML-CP patients ($n=6$); for details, see supplementary material, Figure S3. (B) The frequency of cells expressing surface CD1d was measured by flow cytometry in Mo-DCs (for details, see Materials and methods). HDs, $n=13$; CML-CP patients, $n=16$. (C) Cellular localization of CD1d molecules in Mo-DCs. HLA-DR (green) and CD1d (red) images were acquired by confocal microscopy. The merged images show co-localization of HLA-DR and CD1d (yellow). Scale bar: 10 μm . Images are shown of two separate preparations of normal Mo-DCs (HD1 and HD2) and CML-CP Mo-DCs (CML-CP1 and CML-CP2). The data are representative of four independent experiments. (D) CD1d mRNA levels were measured in Mo-DCs by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR), and normalized to yield equivalent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression. HDs, $n=5$; CML-CP patients, $n=5$. The data shown are means \pm standard errors of the mean (SEM) from two separate experiments. (A, D) Mann-Whitney non-parametric test. ns, not significant. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

iNKT cells that we have recently reported [5]. Knowing that several tumours use CD1d downregulation to evade immune detection [9–12], we examined whether cell surface CD1d was modified in CML-CP mDCs.

Cell surface expression of CD1d is downregulated in peripheral blood mDCs from CML-CP patients, relative to healthy donors (HDs)

Flow cytometry analysis of surface CD1d revealed that <20% CD11c-positive peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) gated *ex vivo* from CML-CP patients were CD1d-positive versus almost 50% of HD mDCs [Figure 1A, B (left panel); supplementary material, Figure S1]. Moreover, CD11c-positive PBMCs from CML-CP patients expressed two-fold less surface CD1d than those recovered from HDs (Figure 1B, right panel). For comparison, gated CD19-positive CML B cells, in which expression of the Ph chromosome is rare, showed cell surface CD1d levels similar to those of their HD counterparts, in terms of both frequency [Figure 1C, D (left panel)] and mean fluorescence intensity (MFI) (Figure 1D, right panel), thereby corroborating BCR-ABL oncogene-mediated downregulation.

Reduced cell surface expression of CD1d in CML-CP mDCs is not associated with decreased intracytoplasmic levels of CD1d or its mRNA transcripts

We analysed the cellular distribution of CD1d molecules in CML-CP mDCs, by using two-colour CD1d staining to differentiate cell surface from intracellular expression. CD1d localization in immature mDCs being mostly intracytoplasmic, mature and immature mDCs from CML-CP patients were examined separately according to their HLA-DR and CD11c expression (supplementary material, Figure S2).

CD1d remained mainly in the cytoplasm of immature mDCs from both HDs and CML-CP patients, with barely detectable membrane expression in either population (Figure 2A, left panel). In mature mDCs from CML-CP patients, membrane CD1d was significantly downregulated versus their HD counterparts, whereas intracellular levels were similar (Figure 2A, right panel). The decreased cell surface display of CD1d cannot be ascribed to defective mDC differentiation, as attested by normal expression of HLA-DR and the CD86 maturation marker (supplementary material, Figure S3A, B). These findings, together with those showing that

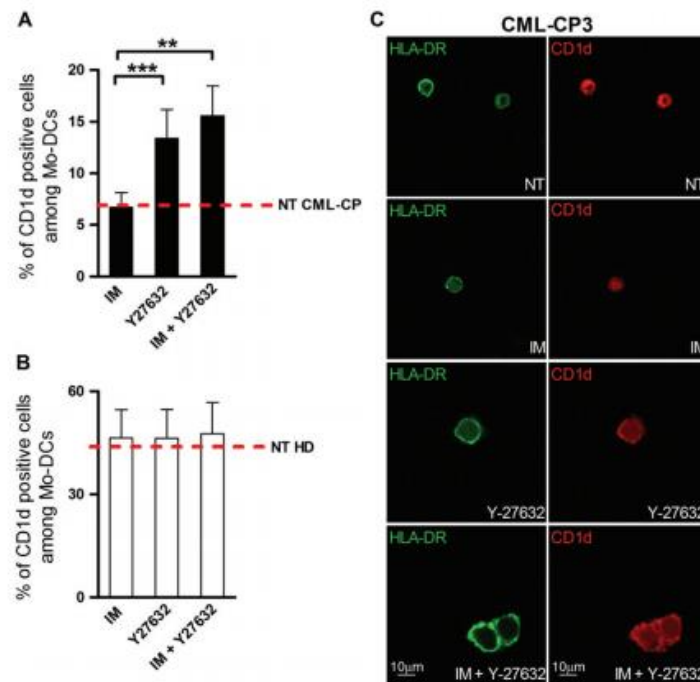


Figure 3. CD1d cell surface expression of CML-CP Mo-DCs after a short-duration *in vitro* treatment with the ROCK inhibitor Y-27632. (A, B) The frequency of cells expressing surface CD1d was measured by flow cytometry on IM-treated and/or Y-27632-treated Mo-DCs from CML-CP patients ($n = 16$) (A) or HDs ($n = 13$) (B). Dotted lines represent mean frequency values in CML-CP Mo-DCs (A) and HD Mo-DCs (B) incubated with medium alone (NT). (C) Cellular localization of CD1d molecules in IM-treated and/or Y-27632-treated or NT Mo-DCs. HLA-DR (green) and CD1d (red) images were acquired by confocal microscopy. Scale bar: 10 μm . Images are shown of Mo-DCs from a representative CML-CP patient (CML-CP3) out of three. (A, B) Wilcoxon non-parametric test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

BCR-ABL in dendritic cells does not influence HLA class I expression, suggest that the defect is specific to CD1d (supplementary material, Figure S3C). To corroborate our findings, we differentiated dendritic cells *in vitro* from Mo-DCs. Up to 98% of these cells were BCR-ABL-positive when derived from CML-CP patients, as determined with FISH (Fluorescence in situ hybridization) (supplementary material, Figure S4). As previously reported [13] and illustrated in supplementary material, Figure S5, mature Mo-DCs of CML-CP patients could not be distinguished from those derived from HD monocytes in terms of HLA-DR and CD86 co-stimulatory molecule expression. Less than 10% of Mo-DCs from CML-PC patients expressed membrane CD1d, contrasting with >40% among those differentiated from HD monocytes (Figure 2B). This procedure provided highly enriched cells to address the mechanism accounting for the deficiency. Using confocal analysis of CML-CP Mo-DCs, we found strong CD1d expression, mostly in the intracytoplasmic compartment (red spots), whereas only HLA-DR appeared on the cell surface (green spots). In contrast, CD1d and HLA-DR were closely co-localized (yellow spots) and attached to the membranes of HD Mo-DCs (Figure 2C).

As previously described, CML-CP Mo-DCs had a distinct morphology, with smaller, more rounded cells, indicative of altered actin organization [13]. These observations, together with CD1d mRNA expression that did not significantly differ between Mo-DCs from CML-CP patients and HDs (Figure 2D), are consistent with intracellular retention of CD1d.

In vitro treatment of CML-CP Mo-DCs with ROCK inhibitors, but not with IM, partially restores cell surface CD1d expression

We attempted to restore normal expression by treating CML-CP Mo-DCs with IM, which had no effect (Figure 3A, C), thereby excluding a major contribution of BCR-ABL TK activity. The Rho-ROCK pathway seemed to be another likely candidate, not only because it is constitutively activated by the DH-PH domain of BCR-ABL, but also because it has been identified as a negative regulator of CD1d-mediated antigen presentation in cell lines via its effects on the actin cytoskeleton [14]. The proportion of CD1d-positive cells among Mo-DCs from CML-CP patients increased after treatment with the ROCK inhibitors Y-27632 (Figure 3A;

supplementary material, Figure S6) and fasudil (supplementary material, Figure S7), whereas it remained unchanged in Mo-DCs from HDs (Figure 3B), supporting a BCR-ABL-dependent effect of the ROCK inhibitors.

As illustrated by the confocal analysis shown in Figure 3C, Y-27632 promoted re-expression of membrane CD1d, unlike IM. It is also noteworthy that CML-CP Mo-DCs recovered a normal morphology, which cannot be explained by a difference in the differentiation stage between CML and normal Mo-DCs. Indeed, surface expression of HLA-DR and the maturation marker CD86 were similar (supplementary material, Figure S5). Further investigations are needed to determine how CD1d retention is mediated. It would be particularly interesting to explore its relationship with actin disorganization in BCR-ABL-positive mDCs [13] through ROCK.

The ROCK inhibitor Y-27632 partially restored CD1d-mediated antigen presentation, unlike IM

To examine how decreased CD1d cell surface expression affects antigen presentation, Mo-DCs from CML-CP patients were loaded with the iNKT cell ligand α -GalCer, and then co-cultured with murine 2C12 iNKT cell hybridoma [15]. IL-2 production by 2C12 cells, used as a readout of CD1d-mediated TCR stimulation, reached 150–200 pg/ml when they were co-incubated with α -GalCer-loaded Mo-DCs from HDs (Figure 4A). Production was significantly reduced when α -GalCer-loaded Mo-DCs from HDs were replaced by their CML-CP counterparts (Figure 4B), suggesting that deficient CD1d membrane expression on mDCs might be the cause of the functional defect of iNKT cells in CML [5]. Accordingly, a direct correlation was found between CD1d expression on mDCs and function of autologous iNKT cells in CML-CP patients (supplementary material, Figure S8). Finally, after treatment with Y-27632, α -GalCer-loaded CML-CP Mo-DCs partially recovered their capacity to stimulate iNKT cell hybridoma (Figure 4B). Overall, the defective proliferation rate of primary CML-CP iNKT cells in response to autologous α -GalCer-loaded Mo-DCs (Figure 4C) was likewise restored *in vitro* with Y-27632, whereas the same treatment had no effect on HD Mo-DCs (Figure 4D).

Given these data, we have concluded that ROCK, which is activated by the DH-PH domain of BCR-ABL, accounts for impaired cell surface CD1d expression in mDCs from CML-CP patients, leading to innate immune evasion.

A role was previously ascribed to ROCK in the control of leukaemia cell motility, leukaemic cell transformation mediated by the BCR/ABL TK and the abnormal increase in proliferation of human CML progenitor cells [16]. Here, we provide the first evidence that ROCK-mediated deregulation likewise affects BCR-ABL-positive immune cells, specifically the mDC pool. As Mo-DCs recovered normal morphology

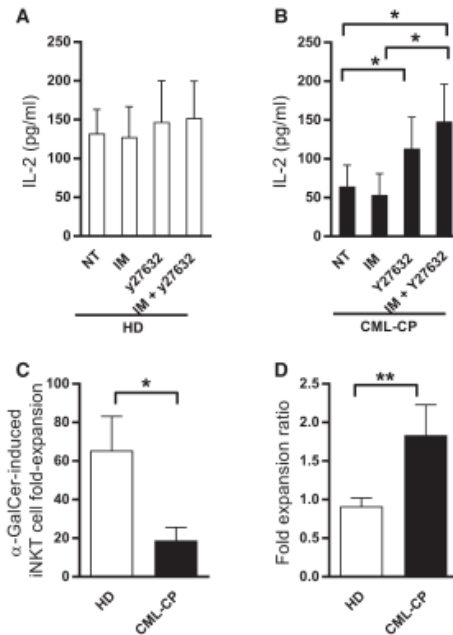


Figure 4. Improvement of the stimulatory effect of CML-CP Mo-DCs on iNKT cells after treatment with the ROCK inhibitor Y-27632. (A, B) Y-27632 partially restored CD1d-mediated presentation to iNKT cell hybridoma, unlike IM. IM-treated and/or Y-27632-treated or NT (no treatment) Mo-DCs (25×10^3 cells) from HDs ($n=5$) (A) or CML-CP patients ($n=7$) (B) were pulsed with 25 ng/ml of the iNKT cell ligand α -GalCer for 16 h, and then co-cultured with iNKT 2C12 hybridoma (50×10^3) for 48 h. Without exogenous α -GalCer stimulation, IL-2 release was almost completely undetectable (<10 pg/ml). IL-2 was evaluated in a sandwich ELISA (R&D Systems). Wilcoxon non-parametric test. * $p < 0.05$. (C, D) Improvement of CD1d-dependent CML-CP iNKT cell expansion when autologous CML-CP Mo-DCs were pretreated with the ROCK inhibitor Y-27632. Y-27632-treated or NT Mo-DCs (50×10^3) from HDs ($n=4$) or CML-CP patients ($n=5$) were pulsed (or not) with 100 ng/ml α -GalCer, and co-cultured with autologous PBMCs (200×10^3) for 7 days. (C) Fold expansion was calculated by dividing the number of iNKT cells recovered from culture with α -GalCer-loaded Mo-DCs by the number recovered from culture with non-loaded Mo-DCs. (D) The fold expansion ratio was calculated by dividing fold expansion values in the presence of Y-27632 by fold expansion values without Y-27632. (C, D) Mann-Whitney non-parametric test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

upon treatment with Y-27632, it can be assumed that downregulation of CD1d surface expression in mDCs from CML-CP patients is not the only consequence of dysfunctional ROCK. This raises the question of how these defects affect the natural killer and/or T-cell responses that are deficient in CML [17,18].

Our evidence for the involvement of the ROCK–mDCs axis in immune surveillance offers new therapeutic perspectives for CML treatment by combining TKI and ROCK inhibitors. This approach could help to restore anti-tumour functions more efficiently and rapidly, thereby preventing drug resistance occurring

during IM therapy alone and the consequences of treatment discontinuation. As fasudil is well tolerated by patients [19], this strategy can easily be implemented clinically.

Author contributions statement

The authors contributed in the following way: SB: designed the experiments, performed the experiments, analysed and interpreted the data, and wrote the manuscript; AL: designed the experiments; NP: provided assistance with cell cultures; FB: performed the FISH assays; FG, LR: provided clinical samples and contributed to the interpretation of data; NB: designed the experiments; AH, JMG: responsible for the overall study design; AH: supervised the project and took primary responsibility for writing the manuscript.

Acknowledgements

We thank D Elewaut for the 2C12 hybridoma cells. We gratefully acknowledge the technical assistance of A Cantreau (ImageUp platform, Université de Poitiers). The authors are especially indebted to E Schneider for critically reviewing the manuscript, the English of which was reviewed by J Arsham, an American medical translator. This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer (Comité de la Vienne et de la Charente Maritime), Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes (ARIM-PC), Association Laurette Fugain (ALF 2015/10), Ministère de la Recherche and INCa-DGOS 8658 (PRT-K2015-052). SB was supported by grants from the Société Française d'Hématologie (SFH) and the Ligue contre le Cancer – Comité de la Vienne.

References

- Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003; **349**: 1451–1464.
- Harnois T, Constantin B, Rioux A, *et al.* Differential interaction and activation of Rho family GTPases by p210bcr-abl and p190bcr-abl. *Oncogene* 2003; **22**: 6445–6454.
- Rochelle T, Daubon T, Troys MV, *et al.* p210bcr-abl induces amoeboid motility by recruiting ADF/detrin through RhoA/ROCK1. *FASEB J* 2013; **27**: 123–134.
- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol* 2016; **91**: 252–265.
- Rosignol A, Levescot A, Jacomet F, *et al.* Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Immunol* 2012; **42**: 1870–1875.
- Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 297–336.
- Hodge S, Hodge G, Flower R, *et al.* Surface and intracellular interleukin-2 receptor expression on various resting and activated populations involved in cell-mediated immunity in human peripheral blood. *Scand J Immunol* 2000; **51**: 67–72.
- Jacomet F, Cayssials E, Basbous S, *et al.* Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. *Eur J Immunol* 2015; **45**: 1926–1933.
- Spanoudakis E, Hu M, Naresh K, *et al.* Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d. *Blood* 2009; **113**: 2498–2507.
- Hix LM, Shi YH, Brutkiewicz RR, *et al.* CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis. *PLoS One* 2011; DOI: 10.1371/journal.pone.0020702.
- Weinkove R, Brooks CR, Carter JM, *et al.* Functional invariant natural killer T-cell and CD1d axis in chronic lymphocytic leukemia: implications for immunotherapy. *Haematologica* 2013; **98**: 376–384.
- Guo W, Dong A, Xing C, *et al.* CD1d levels in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett* 2014; **8**: 825–830.
- Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, *et al.* Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* 2003; **101**: 3560–3567.
- Gallo RM, Khan MA, Shi J, *et al.* Regulation of the actin cytoskeleton by Rho kinase controls antigen presentation by CD1d. *J Immunol* 2012; **189**: 1689–1698.
- Brossay L, Chioda M, Burdin N, *et al.* CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 1998; **188**: 1521–1528.
- Burthem J, Rees-Unwin K, Mottram R, *et al.* The rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil act synergistically with imatinib to inhibit the expansion of ex vivo CD34(+) CML progenitor cells. *Leukemia* 2007; **21**: 1708–1714.
- Chen CI-U, Koschmieder S, Kerstiens L, *et al.* NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. *Leukemia* 2012; **26**: 465–474.
- Mumprecht S, Schürch C, Schwaller J, *et al.* Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 2009; **114**: 1528–1536.
- Shimokawa H, Hiramori K, Iinuma H, *et al.* Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; **40**: 751–761.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

Supplementary materials and methods

Figure S1. Gating strategy to define mDCs (CD11c(+) cells) on viable PBMCs.

Figure S2. Combined flow cytometric analysis of surface and intracellular CD1d.

Figure S3. CD86 and HLA-DR surface expressions were not affected in peripheral blood mDCs from CML-CP patients.

ANNEXE 4 : CARACTÉRISTIQUES DES PATIENTS DE LA COHORTE INCLUSE DANS L'ESSAI DASATINIB-PEGIFN

	All (n=38)	DMR*	
		M12- noDMR (n=22)	M12- DMR (n=16)
Age (years)	45 ± 12	42 ± 12	48 ± 12
Sex, n (%)			
F	15 (39%)	6 (27%)	9 (56%)
M	23 (61%)	16 (73%)	7 (44%)
Sokal score, n (%)			
Low (< 0.8)	25 (66%)	11 (50%)	14 (88%)
Int/high (≥ 0.8)	13 (34%)	11 (50%)	2 (12%)

As expected, the M12-DMR group had a higher proportion of patients with a low sokal score (< 0.8)

*DMR: deep molecular response (BCR-ABL1/ABL1 IS ≤ 0.01%)

Les lymphocytes T CD8 innés et immunosurveillance antitumorale : application au modèle de la leucémie myéloïde chronique

Nous avons récemment identifié chez l'Homme une nouvelle sous population lymphocytaire T constituée par les lymphocytes T (LT) CD8 innés. Ils possèdent un TCR $\alpha\beta$, expriment le facteur de transcription Eomesodermine, les récepteurs membranaires KIR/NKG2A et sont dotés de fonctions de type « *Natural Killer* » (*NK-like*). Leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles sont compatibles avec leur définition comme potentiel équivalent humain des LT CD8 « *innate memory* » décrits chez la souris, dont la génération dépend de la sécrétion de l'IL-4 par les LT exprimant le facteur de transcription « *promyelocytic leukemia zinc finger protein* » (PLZF), notamment les lymphocytes « *invariant Natural Killer T* » (iNKT). Nous avons pris appui sur le modèle physiopathologique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) pour tester l'implication potentielle des LT CD8 innés dans l'immunosurveillance antitumorale chez l'Homme. Ce choix repose sur le fait qu'en matière de cancers, la LMC constitue un modèle d'étude du rôle du SI, comme l'attestent les données de la littérature documentant que les lymphocytes sont capables de contrôler la maladie.

La LMC est une hémopathie maligne de la famille des syndromes myéloprolifératifs qui résulte de la formation d'un gène chimérique *BCR-ABL1*, lequel est responsable de l'expression d'une protéine dont l'activité tyrosine kinase est dérégulée. Le traitement de la LMC repose sur une thérapie ciblée non curative : les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) dont le chef de file est l'imatinib. Nous avons précédemment montré que les lymphocytes iNKT, une sous population T innée dont l'implication dans l'immunosurveillance antitumorale est clairement établie chez l'Homme et la Souris, sont anergiques chez les patients en LMC au diagnostic de la maladie. Leur défaillance fonctionnelle, notamment en termes de sécrétion d'IL-4, est corrigée chez les patients obtenant une rémission cytogénétique complète sous traitement par imatinib.

Tout comme pour les lymphocytes iNKT, nos résultats montrent au diagnostic de la maladie un déficit numérique profond des LT CD8 innés, auquel s'ajoute une altération sévère de leurs fonctions *NK-like* (capacité de sécrétion d'IFN- γ en réponse à une combinaison de cytokines pro-inflammatoires IL-12+IL-18 et de cytotoxicité *via* CD16). De manière intéressante, nous avons observé chez les patients traités par imatinib et en rémission moléculaire majeure (RMM), une restauration numérique et fonctionnelle partielle en termes de sécrétion d'IFN- γ de type inné des LT CD8 innés. Les données collectées chez les témoins sains, les patients au diagnostic de la maladie et en RMM sous ITK, en mettant en évidence une association entre la fréquence des lymphocytes iNKT et celle des LT CD8 innés, renforcent l'hypothèse de l'existence chez l'Homme, à l'instar de chez la Souris, d'un axe iNKT/ LT CD8 innés.

Pour éprouver notre hypothèse que les LT CD8 innés participent au contrôle de la LMC, nous avons analysé leur statut chez des patients en rémission prolongée après arrêt de leur ITK en dépit de la persistance d'une maladie résiduelle tumorale. Chez ces patients, un taux significativement plus élevé de LT CD8 innés est mis en évidence comparativement aux patients en RMM sous ITK et aux témoins sains. Leurs capacités fonctionnelles sont, de plus, restaurées de manière complète en référence aux sujets sains.

L'ensemble de ces résultats qui plaide en faveur d'une implication des LT CD8 innés dans l'immunité anti-leucémique au cours de la LMC, nous conduits à émettre l'hypothèse qu'ils pourraient constituer un biomarqueur potentiel du succès d'arrêt du traitement par ITK dans la LMC et nous encouragent à explorer des stratégies d'immunothérapie antitumorale visant à valoriser leurs propriétés fonctionnelles.

Mots clés : immunosurveillance antitumorale, lymphocytes T innés, lymphocytes iNKT, lymphocytes T CD8 innés, leucémie myéloïde chronique

Innate CD8 T-cells and cancer immunosurveillance applied to chronic myeloid leukemia

We have recently identified a new subset of innate T cells in humans, which we have termed « innate CD8 T-cells ». These cells express TCR $\alpha\beta$ along with the transcription factor Eomesodermine (Eomes) and KIR/NKG2A membrane receptors. Innate CD8 T-cells share functional and phenotypic features with “innate memory” CD8 T-cells discovered in mice in the early 2000s. The development of these cells depends on the secretion of IL-4 by the T cells expressing the transcription factor Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF), and particularly iNKT, also called « invariant Natural Killer T-cells ». We have used the physiopathological model of chronic myeloid leukemia (CML) to study the potential role of innate CD8 T-cells in anticancer immunity in humans. Indeed, CML is considered to be one of the cancers most sensitive to immunological manipulation.

CML is a malignant hemopathy that belongs to the family of myeloproliferative neoplasms characterized by the presence of the BCR-ABL1 oncogene. This oncogene is responsible for expression of the oncoprotein BCR-ABL with deregulated tyrosine kinase activity. Tyrosine kinase inhibitors (TKI) represent the standard of care for CML patients, of which the first in class was Imatinib. This targeted therapy has dramatically improved CML patients' outcomes, but they cannot achieve a cure. We previously reported that iNKT lymphocytes, a sub-population of innate T cells of which the implication into anti-tumoral immunosurveillance has been clearly demonstrated in human and in mouse models, are anergic in CML patients at diagnosis. Although these cells are functionally impaired, particularly in terms of IL-4 secretion, we have shown that their functional deficiencies are totally restored in CML patients in complete cytogenetic remission upon Imatinib therapy.

Similarly to the iNKT lymphocytes, we presently show a major defect in the innate CD8 T-cells during the chronic phase in CML patients compared to those of healthy donors (HD) or patients in major molecular remission (MMR). This numerical defect is associated with a loss of NK-like functions (interferon- γ expression after innate stimulation by IL-12+IL-18 cytokines and with a loss of degranulation after stimulation via CD16). Interestingly, we have observed in patients in MMR under Imatinib a numeric and functional restoration that is at least partial, in terms of interferon- γ secretion after innate stimulation, of the innate CD8 T-cells.

In analysis of cohorts of HD, CML patients at diagnosis and those in MMR under TKI, we have observed a correlation between Eomes expression by innate T CD8 T-cells and PLZF expression by iNKT cells. This finding underscores a possible dynamic process of generation of innate CD8 T-cells in humans that would depend on iNKT cells, as is the case in mice.

To test the hypothesis that innate CD8 T-cells contribute to the control of CML, we have analyzed their status in a cohort of CML patients who, in spite of a persistent minimal residual disease, had maintained remission (MMR) more than two years after TKI discontinuation. In these patients, we demonstrate a dramatic increase of functional active innate CD8 T-cells as compared to HD and patients in MMR under TKI. All in all, these results underscore the major role of innate CD8 T-cells in anti-leukemic immunity during CML disease. We believe and we will test the hypothesis that the numeric and functional restoration of this subset might constitute a potential biomarker of successful TKI cessation in CML. We will also investigate whether innate CD8 T-cells could be a target for immunotherapy-based strategy.

Keywords: cancer immunosurveillance, innate T lymphocytes, iNKT lymphocytes, innate CD8 T lymphocytes, chronic myeloid leukemia