

ANNÉE 2013-2014

N° 095

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Bérengère Salomé

Présentée et soutenue publiquement le 3 novembre 2014

**IMMUNITÉ INNÉE ANTI-TUMORALE :
IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE
NOUVEAUX ACTEURS CELLULAIRES A VISÉE
THÉRAPEUTIQUE**

Président : Pr. Virginie FERRE, Doyen, PU-PH en Virologie

Membres du jury : Dr. Stéphane BIRKLE, MCU en Immunologie
Pr. Gilles BLANCHO, Directeur de l'ITUN, PU-PH

Remerciements

À Dr. Stéphane Birklé,

Pour m'avoir accompagnée durant l'écriture de cette thèse ;

À Pr. Virginie Ferré et Pr. Gilles Blancho,

Pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse ;

À Pr. Pedro Romero,

Pour m'avoir accueillie dans son laboratoire durant mon stage de Master ;

À Dr. Camilla Jandus et Dr. Sara Trabanelli,

Pour leur soutien, leur contribution aux expériences et leurs précieux conseils ;

À Pr. Daniel Speiser et Dr. Jean-Paul Rivals,

Pour la provision d'échantillons de sang périphérique de patients cancéreux ;

À tous mes collègues du centre Ludwig, en particulier :

Sintia Winkler, pour m'avoir formée à la cytométrie en flux ;

Dr. Mathilde Allard, pour m'avoir aidée à la réalisation des figures ;

Carla Costa-Nunes, Dr. Natacha Bordry, Amélie Cachot et Rebecca Panès, pour leur
bonne humeur et leur soutien quotidien ;

**Et, bien sûr, un immense merci à ma famille et à mes amis pour m'avoir
soutenue durant mes (longues) études et, en particulier, pendant l'écriture
de cette thèse...**

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléasique

ADNc : ADN complémentaire

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BCR : *B-cell Receptor* : Récepteur des lymphocytes B

CAR : *Chimeric Antigen Receptor* : Récepteur Antigénique Chimérique

CCL : *C-C Chemokine Ligand* : Ligand chimiokine à motif C-C

CCR : *C-C Chemokine Receptor* : Récepteur aux chimiokines à motif C-C

CD : *Cluster of Differentiation* : Marqueur de différenciation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

CTLA4 : *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* : Protéine de type 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques

CXCL : *C-X-C Chemokine Ligand* : Ligand chimiokine à motif C-X-C

CXCR : *C-X-C Chemokine Receptor* : Récepteur aux chimiokines à motif C-X-C

DR : *Death receptor* : Récepteur de mort cellulaire

DcR : *Death decoy Receptor* : Récepteur leurre de mort cellulaire

FADD : *Fas-associated protein with death domain* : Protéine associée à Fas à domaine de mort cellulaire

FcγR : *Fcγ Receptor* : Récepteur de type Fcγ

HER : *Human Epidermal growth factor Receptor* : Récepteur aux facteurs de croissance épidermiques humains

HLA : *Human Leukocyte Antigen* : Antigène leucocytaire humain

iGB : *Germinal center-like B cells* : Lymphocytes B à morphologie associée aux centres germinaux

IFN : Interféron

ILC : *Innate Lymphoid Cells* : Cellules lymphoïdes innées

LLT1 : *Lectin-like transcript 1* : Transcrit 1 de type lectine

LTi : *Lymphoid-Tissue Inducer cell* : Cellules inductrices de tissus lymphoïdes

MDSC : *Myeloid-Derived Suppressor Cell* : Cellule Suppressive Myéloïde

NCR : *Natural Cytotoxicity Receptor* : Récepteur de cytotoxicité naturelle

NK : *Natural Killer cell* : Cellule tueuse naturelle

NKG : *Natural Killer cell group receptor* : Récepteur de la famille des cellules tueuses naturelles

NKT : *Natural Killer T cell* : Lymphocyte T tueur naturel

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell* : Cellule mononucléée du sang périphérique

PBS : *Phosphate Buffered Saline*: Solution tamponnée phosphatée

PCR : *Polymerase Chain Reaction* : Réaction de polymérisation en chaîne

TACTILE : *T-cell activation, increased late expression* : Activation des lymphocytes T et à expression tardivement augmentée

TCR : *T-cell Receptor* : Récepteur des lymphocytes T

Th : *T helper cell* : Lymphocyte T auxiliaire

TIGIT : *T-cell Immunoglobulin- and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-domain* : domaine à motif inhibiteur basé sur les immunoglobulines des lymphocytes T et les tyrosines des récepteurs immuns

TIL : *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* : Lymphocytes infiltrant les tumeurs

TIM-3 : *T-cell immunoglobulin- and mucin-containing- molecule-3* : Molécule de type immunoglobuline des lymphocytes T contenant des mucines

TLR : *Toll-Like Receptor* : Récepteur apparenté aux récepteurs Toll

TNF : *Tumor Necrosis Factor* : Facteur de nécrose tumorale

Trail : *TNF-related apoptosis-inducing ligand* : Ligand apparenté au TNF et induit par l'apoptose

TSLP : *Thymic Stromal Lymphopoietin* : Lymphopoïétine stromale thymique

SOMMAIRE

Introduction

Partie 1 : Revue Bibliographique

1.1 Immunothérapies anti-tumorales chez l'Homme	2
1.1.1 Physiologie du cancer et réponse immune anti-tumorale	2
1.1.2 Intérêt de l'immunothérapie anti-tumorale	7
1.1.2.1. Limites des stratégies thérapeutiques anti-tumorales de premières lignes	7
1.1.2.1.1 Chirurgie.....	7
1.1.2.1.2 Radiothérapie	8
1.1.2.1.3 Chimiothérapie	9
1.1.2.1.4 Hormonothérapie.....	10
1.1.2.2. Immunothérapie anti-tumorale.....	11
1.1.2.2.1 Principe et classification.....	11
1.1.2.2.2 Immunothérapies passives : Anticorps monoclonaux	11
1.1.2.2.3 Immunothérapies actives.....	12
1.1.2.2.3.1. Non spécifiques : Cytokines	13
1.1.2.2.3.2 Spécifiques : Vaccination thérapeutique	13
1.1.2.2.4 Immunothérapies adoptives.....	14
1.1.3 Transferts adoptifs cellulaires anti-tumoraux chez l'Homme	15
1.1.3.1. Lymphocytes T $\alpha\beta$	15
1.1.3.2 Lymphocytes T $\gamma\delta$	19
1.1.3.3 Cellules NKT	21
1.1.3.4 Cellules NK.....	23
1.1.3.5 Cellules dendritiques.....	27
1.1.3.6 Macrophages	30

1.1.3.7 Autres stratégies en cours d’investigation pré-clinique	32
1.1.3.7.1 Lymphocytes B	32
1.1.3.7.2 Fibroblastes	34
1.2 Les cellules lymphoïdes innées (ILC) : une famille de cellules immunes récemment identifiées.....	35
1.2.1 Classification et nomenclature.....	35
1.2.2 Développement.....	37
1.2.3 Rôles	39
1.2.3.1 Induction des ILC lors d’inflammation et de cancer.....	39
1.2.3.2 Réponse cytotoxique	40
1.2.3.3 Recrutement des cellules immunitaires innées	40
1.2.3.4 Soutien de la réponse immune adaptative.....	41
1.2.3.5.1. ILC et réponse lymphocytaire T.....	41
1.2.3.5.2. ILC et réponse lymphocytaire B	42
1.2.3.5 Réparation tissulaire.....	42
1.2.3.6 Influence sur la vascularisation tumorale.....	43
Partie 2 : Les cellules lymphoïdes innées	
2.1 Introduction	44
2.2 Matériel et méthodes	46
2.2.1 Donneurs humains	46
2.2.2 Préparation des échantillons	46
2.2.3 Cytométrie en flux	46
2.2.4 Stratégie de caractérisation des ILC	49
2.2.5 Extraction de l’ARN et transcription en ADNc.....	53

2.2.6 Amplification par PCR de l'ADNc et électrophorèse	53
2.2.6 Méthodes statistiques.....	54
2.3 Résultats - Discussion.....	55
2.3.1 Dérégulation de la proportion des ILC lors de cancer.....	55
2.3.2 Migration des ILC vers les tissus sains et cancéreux	57
2.3.3 Communication entre les ILC et les cellules tumorales	60
2.3.3.1 <i>Via</i> CD27/CD70.....	63
2.3.3.2 <i>Via</i> TIM-3/Galectin-9	65
2.3.3.3 <i>Via</i> CD155/Tactile	66
2.3.3.4 <i>Via</i> Siglec-7 et ses ligands	68
2.3.3.5 <i>Via</i> la voie des récepteurs de mort cellulaire	70
2.3.3.5.1 Fas	70
2.3.3.5.2 Trail	72
2.3.4 ILC et micro-environnement tumoral.....	75
2.3.5 Les ILC : activatrices du système immunitaire et régulées par celui-ci ?.....	77
2.3.5.1 Possible rôle des ILC dans l'activation des lymphocytes T.....	77
2.3.4.2 Modulation de la fonction des ILC par les cellules immunitaires	81
2.3.5 Les ILC : cibles des adjuvants des immunothérapies <i>via</i> leurs TLR ?.....	83

Conclusion

Bibliographie

Liste des figures

Figure 1. La théorie des 3 E de l' <i>immunoediting</i> du cancer.....	2
Figure 2. Réponse immune anti-tumorale : Phase d'élimination.....	4
Figure 3. Les cellules du micro-environnement tumoral.....	5
Figure 4. Effets anti-tumoraux des anticorps monoclonaux.....	12
Figure 5. Différentes approches de transfert adoptif anti-tumoral de lymphocytes T.	16
Figure 6. Représentation schématique d'un récepteur antigénique chimérique CAR.	18
Figure 7. Reconnaissance de cellules cibles par les lymphocytes $\gamma\delta$	20
Figure 8. Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK.....	23
Figure 9. Intérêt de l'utilisation d'incompatibilités KIR en thérapie anti-tumorale.....	24
Figure 10. Étapes du transfert adoptif de cellules dendritiques chez l'Homme.	28
Figure 11. Représentation schématique des sous-types d'ILC.....	36
Figure 12. Étapes de développement des ILC.....	37
Figure 13. Détermination du seuil de positivité de fluorescence des ILC pour un marqueur d'intérêt.....	48
Figure 14. Détermination des seuils de positivité de fluorescence des ILC pour chaque marqueur d'intérêt.....	51
Figure 15. Stratégie de caractérisation des ILC par cytométrie de flux.....	52
Figure 16. Comparaison de la proportion des ILC dans le sang périphérique de donneurs sains et de patients atteints de cancer.	56
Figure 17. Détermination de l'expression des récepteurs aux chimiokines par les ILC.....	61
Figure 18. Détermination de l'expression des molécules d'adhésion CD44 et CD62L par les ILC.	62
Figure 19. Détermination de l'expression de CD27 et CD70 par les ILC.	64
Figure 20. Détermination de l'expression de TIM-3 par les ILC.....	66
Figure 21. Détermination de l'expression de TACTILE par les ILC.	68
Figure 22. Détermination de l'expression de Siglec-7 par les ILC.....	69
Figure 23. Voie de signalisation de Fas/FasL.....	71
Figure 24. Détermination de l'expression de Fas (CD95) et FasL par les ILC.....	72
Figure 25. Voie de signalisation de Trail.....	73
Figure 26. Détermination de l'expression de TRAIL par les ILC.	74
Figure 27. Ecto-enzymes et kinases extra-cellulaires impliquées dans la génération d'adénosine.....	75
Figure 28. Détermination de l'expression des ecto-enzymes CD39 et CD73 par les ILC.	76
Figure 29. Synapse immunologique de présentation antigénique par les CPA aux lymphocytes T.....	78
Figure 30. Détermination de l'expression de molécules d'activation des lymphocytes T et B par les ILC.	80
Figure 31. Détermination de l'expression de CD94 et CD161 par les ILC.	82
Figure 32. Expression génique des TLR1-10 par les ILC.....	85

Liste des tableaux

Tableau 1. Anticorps utilisés en cytométrie de flux.....	47
Tableau 2. Caractérisation des ILC en cytométrie de flux.	53
Tableau 3. Séquences nucléotidiques des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification de l'ADNc par PCR.	54
Tableau 4. Phénotype des ILC dans le sang périphérique de donneurs sains.	59
Tableau 5. Expression de l'ADNc des TLR par les ILC de sang périphérique humain.	84

Liste des annexes

Annexe 1 : Poster présenté lors du congrès EMBO ILC1

INTRODUCTION

Fort d'une incidence de 3,4 millions et d'une mortalité de 1,75 millions de personnes en Europe en 2012, le cancer constitue un véritable fléau mondial affectant tant les hommes que les femmes¹. Quatre types pathologiques sont à eux seuls responsables de la moitié des nouveaux cas observés en 2012 : le cancer du sein, le cancer de la prostate, le cancer du poumon et le cancer colorectal¹. Ces observations mettent en évidence le manque de prévention et de traitement contre cette pathologie de santé publique.

De nombreuses équipes de recherche se consacrent ainsi à la découverte de nouvelles thérapeutiques du cancer. La limite des stratégies couramment utilisées en premières intentions a conduit à l'émergence d'un nouveau domaine, l'immunothérapie, porteur d'espoirs de guérison du cancer. Sont recensés au sein de l'Union européenne, au moment de l'écriture de cette thèse et depuis le 1^{er} mai 2004, 23491 essais cliniques évaluant la faisabilité, la toxicité et/ou l'efficacité de cette approche dans le cancer².

Le centre Ludwig de recherche sur le cancer de Lausanne fait partie des établissements se consacrant à l'immunothérapie du cancer chez l'Homme. Un des nombreux projets du groupe de recherche translationnelle sur l'immunologie des tumeurs, où j'ai collecté les données présentées dans la deuxième partie de ce mémoire, concerne la caractérisation de nouveaux effecteurs de la réponse immunitaire afin de les utiliser dans l'immunothérapie anti-tumorale.

Ce mémoire a pour objectif de démontrer l'intérêt de l'étude des cellules lymphoïdes innées, effecteurs immuns récemment découverts, dans le cancer et de prouver le rationnel de la perspective d'utilisation de ces cellules dans l'immunothérapie anti-tumorale. Pour ce faire, nous avons établi la proportion de ces cellules chez l'Homme en contexte sain et cancéreux et déterminé de façon étendue et minutieuse leur phénotype en contexte sain.

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Immunothérapies anti-tumorales chez l'Homme

1.1.1 Physiologie du cancer et réponse immune anti-tumorale

Ainsi nommé par Hippocrate en référence à la ressemblance entre les multiples vaisseaux sanguins entourant les tumeurs et les pattes des crabes, le cancer, du grec *καρκινος* (karkinos), peut être défini à trois niveaux. Moléculairement, celui-ci est une pathologie de l'ADN aboutissant à des dysfonctionnements cellulaires. Cellulairement, il est caractérisé par une prolifération incontrôlée et, tissulairement par la capacité de ses cellules à essaimer à distance du tissu d'origine.

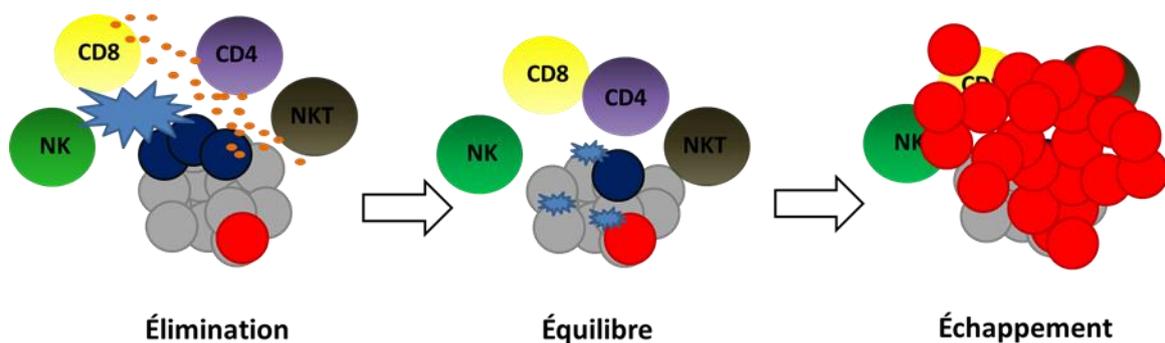


Figure 1. La théorie des 3 E de l'immunoediting du cancer. L'immunoediting du cancer fait intervenir trois étapes. L'élimination correspond à l'immunosurveillance. L'équilibre représente le processus par lequel le système immunitaire sélectionne ou promeut la génération de cellules variantes tumorales résistantes à l'attaque immune. L'échappement fait intervenir une expansion tumorale incontrôlée chez l'hôte immunocompétent. Les cellules tumorales proliférant (bleu), les variants cellulaires tumoraux (rouge) et les cellules non transformées (gris) sont représentés; Les points orange représentent les cytokines et les éclairs l'activité cytotoxique anti-tumorale des lymphocytes.

Maladie progressive échappant à de nombreux contrôles physiologiques, le cancer débute par l'exposition de l'individu à un stress, lors d'infection chronique virale ou bactérienne ou encore lors d'exposition à des agents chimiques ou physiques. Le génome est en effet soumis à de fines régulations mais peut être altéré par ce stress. Ceci peut, en particulier, conduire à l'activation de pro-oncogènes en oncogènes et à l'inhibition de gènes

suppresseurs de tumeur ou de gardiens du génome qui, à l'état non muté, régulent la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN. La cellule acquérant ces altérations génétiques devient alors tumorale. Des lésions pré-cancéreuses apparaissent, de cette façon, chez un individu si celui est exposé régulièrement à un stress et si son système immunitaire ne peut éliminer les cellules transformées tumorales générées.

Cependant, ces lésions ne deviendront cancéreuses primaires que lors de certains contextes, tels que l'altération du micro-environnement tumoral ou l'immunodépression. L'évolution des tumeurs est régie par le concept d'*immunoediting* de la théorie des 3E : Élimination, Équilibre, Échappement³ (Figure 1). En effet, à partir d'une certaine taille, la tumeur recrute des cellules de l'immunité innée telles que les cellules dendritiques, les cellules tueuses naturelles « NK » (*Natural Killer*), les lymphocytes T *gamma delta* « T $\gamma\delta$ », les cellules tueuses naturelles T « NKT » (*Natural Killer T cells*) et les macrophages. Celles-ci débute alors la lyse tumorale, en particulier par l'activation de cellules immunes grâce à la production d'une cytokine inflammatoire, l'interféron gamma (IFN γ), mais surtout mettent en place une réponse immune adaptative qui, elle, peut compléter l'élimination de la tumeur. Effectivement, les cellules dendritiques ingèrent des débris tumoraux puis migrent vers les ganglions lymphatiques afin de présenter des antigènes issus de ces débris aux lymphocytes T (Figure 2). Des lymphocytes T CD4 et T CD8 effecteurs spécifiques de la tumeur sont alors activés et migrent vers le site tumoral afin de lyser les cellules cancéreuses grâce à la reconnaissance d'antigènes tumoraux lors de contact avec celles-ci. Une liste exhaustive des antigènes tumoraux connus chez l'Homme est disponible sur le site du journal *Cancer Immunity*⁴. Ces antigènes peuvent être :

- naturellement présents dans l'organisme mais surexprimés sur les cellules tumorales ;
- caractéristiques de cellules différenciées de l'organisme ;
- présents sélectivement sur les cellules germinales (*Cancer-testis antigens*)
- issus de mutation et, ainsi, présents spécifiquement sur les cellules tumorales.

Si le processus lytique mis en place par le système immunitaire de l'hôte n'aboutit pas à l'élimination complète des cellules tumorales, s'ensuit une phase d'équilibre pouvant durer plusieurs années, durant laquelle la tumeur est soumise à une pression de sélection par le système immunitaire. Les cellules tumorales acquièrent donc des mutations et, si celles-ci confèrent une résistance aux clones contre les défenses immunitaires mises en place, la tumeur échappe à celles-ci et le cancer se généralise, entraînant alors l'apparition de métastases.

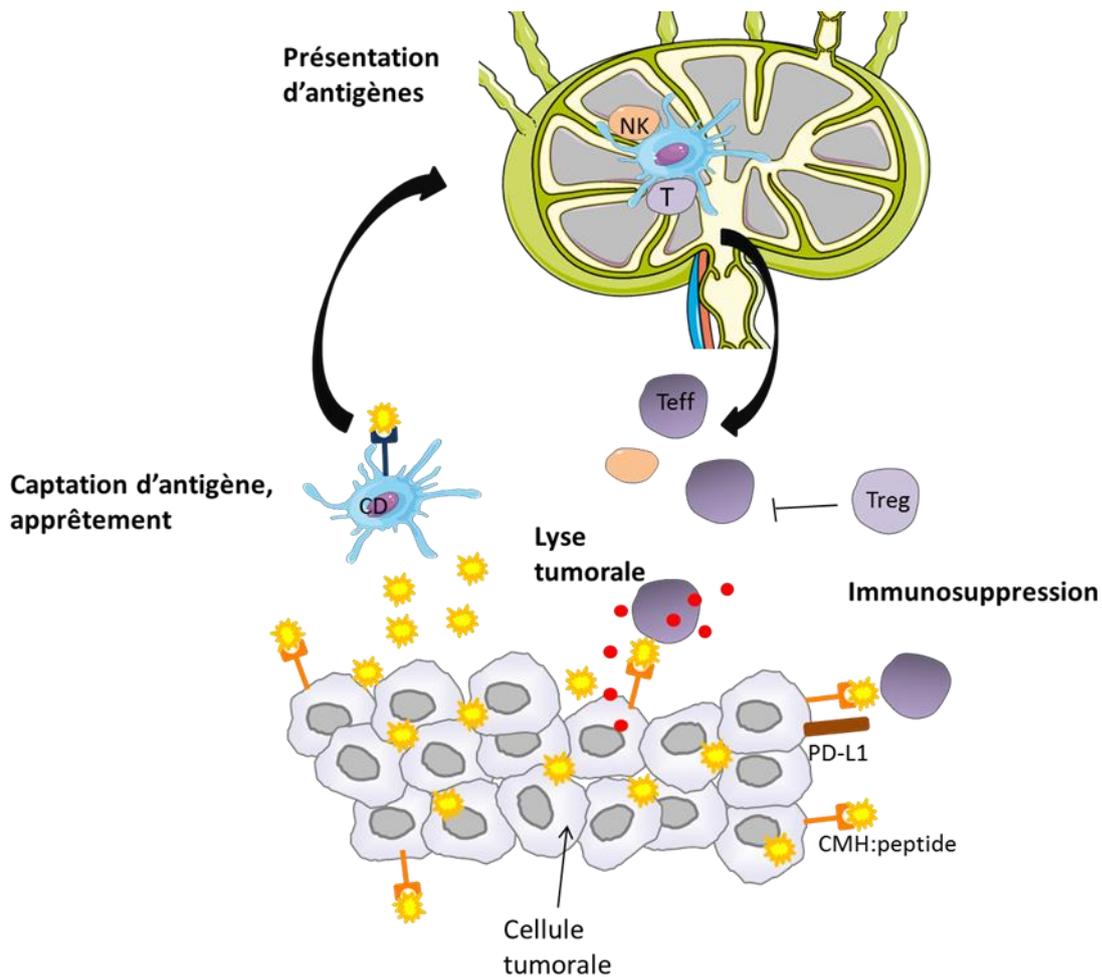


Figure 2. Réponse immune anti-tumorale : Phase d'élimination. L'initiation de la réponse immune anti-tumorale consiste en la capture d'antigènes associés aux tumeurs par les cellules dendritiques qui les dégradent et les apprêtent pour leur présentation avant de migrer vers les ganglions lymphatiques. Si ces phénomènes ont lieu en présence de stimulus immunogénique de maturation, les cellules dendritiques peuvent induire la migration de lymphocytes T effecteurs spécifiques anti-tumoraux au site de la tumeur. Si aucun stimulus n'a été délivré, ces cellules entraînent au contraire une tolérance aboutissant à la délétion ou l'anergie de lymphocytes T ou à la génération de lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T effectifs anti-tumoraux quittent alors le ganglion, au même titre que les cellules NK, et migrent vers le site tumoral, où ils peuvent induire une lyse tumorale ou voir leur fonction inhibée en cas de mise en place, par la tumeur, de mécanismes d'immunosuppression, telle que l'augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.

Plusieurs mécanismes concourent à l'acquisition de résistance par les cellules tumorales. La diminution d'expression, à leur surface, de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) peut ainsi empêcher le système immunitaire de les reconnaître. Cependant, les cellules tumorales peuvent également rendre inefficaces les mécanismes de

lyse mis en place par celui-ci, induire un micro-environnement tumoral immunosuppresseur et inhiber la migration des cellules immunes au site tumoral.

Le micro-environnement tumoral est constitué de cellules souches cancéreuses mais aussi de cellules immunitaires, telles que les lymphocytes infiltrant les tumeurs « TIL » (*Tumor-infiltrating Lymphocytes*), de fibroblastes associés aux cancers, de cellules endothéliales entourées par des péricytes et de cellules myéloïdes (cellules suppressives myéloïdes et polynucléaires neutrophiles) (Figure 3). En effet, les cellules tumorales induisent une prolifération des cellules endothéliales et le chimiotactisme de celles-ci vers le site tumoral, aboutissant à la formation de néo-vaisseaux fragiles irriguant la tumeur⁵.

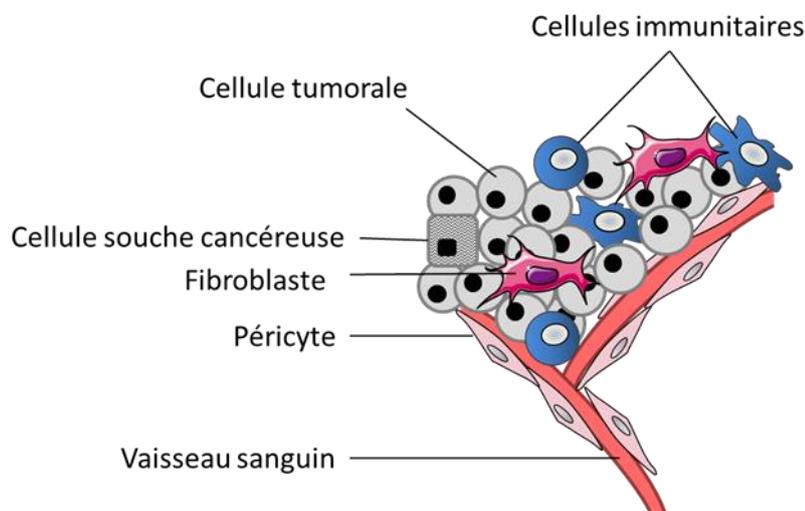


Figure 3. Les cellules du micro-environnement tumoral. Le parenchyme et le stroma des tumeurs contiennent divers types et sous-types cellulaires régulant la croissance et la progression tumorale. Notamment, les cellules inflammatoires immunitaires présentes dans les tumeurs incluent des sous-catégories cellulaires promouvant ou lysant la tumeur.

L'établissement d'un micro-environnement immunosuppresseur peut soutenir la tumeur dans sa lutte contre la réponse immune de l'hôte. Celui-ci peut, par exemple, empêcher les cellules dendritiques de mûrir et, par conséquent, de stimuler efficacement les lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques, aboutissant à la différenciation de ceux-ci en lymphocytes T anergiques et tolérogènes, c'est-à-dire non fonctionnels, ou en lymphocytes T régulateurs inhibant la réponse immune (Figure 2). Les cellules tumorales peuvent également s'entourer d'une matrice dense de collagène régulant l'infiltration immune⁶. Enfin, celles-ci peuvent surexprimer des ligands de récepteurs inhibiteurs tels que PD-L1 inhibant les fonctions

effectrices des lymphocytes T fonctionnels qui auraient réussi à établir un contact avec ces cellules tumorales⁷ (Figure 2).

Les cellules tumorales sont ainsi de redoutables ennemis du système immunitaire par leur mise en place de mécanismes permettant de contourner les défenses de l'hôte et d'envahir l'organisme. Leurs atouts résident notamment en leur potentiel prolifératif soutenu (grâce à leur insensibilité aux signaux suppresseurs de croissance cellulaire délivrés par les cellules environnantes), à leur autosuffisance en facteurs de croissance, au blocage des voies cellulaires apoptotiques, à leur potentiel réplicatif infini par inhibition de la dégradation de leurs télomères et à la dérégulation de leur métabolisme énergétique. Les cellules tumorales peuvent également échapper à la réponse immune grâce, en particulier, à leur importante plasticité génétique, mais également détourner les mécanismes physiologiques de l'organisme à leur avantage en attirant la formation de vaisseaux sanguins vers le site tumoral et en induisant une réponse inflammatoire⁵. Effectivement, les infiltrats cellulaires tumoraux et inflammatoires possèdent de nombreuses similarités. L'inflammation ainsi induite par la tumeur engendre la sécrétion de divers composés dans le micro-environnement tumoral. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer les espèces réactives de l'oxygène, qui augmentent le pouvoir mutagène exercé sur les cellules tumorales et, ainsi, stimulent leur évolution génétique. D'autres molécules relarguées grâce au processus inflammatoire dans ce milieu sont dites bioactives et stimulent l'homéostasie du microenvironnement cellulaire tumoral, telles que des facteurs de croissance, de survie, de pro-angiogénèse et des enzymes modifiant la matrice extra-cellulaire. Ces dernières stimulent, en particulier, l'invasion, l'angiogénèse et le pouvoir métastatique des tumeurs.

1.1.2 Intérêt de l'immunothérapie anti-tumorale

De nombreuses stratégies thérapeutiques ont par conséquent vu le jour, tant préventives et curatives que palliatives afin de combattre le cancer chez l'Homme. Seront détaillées ci-dessous les approches anti-tumorales curatives afin de mettre en évidence l'intérêt de l'immunothérapie anti-tumorale en tant que traitement du cancer.

1.1.2.1. Limites des stratégies thérapeutiques anti-tumorales de premières lignes

Les stratégies thérapeutiques de premières lignes actuelles regroupent la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie.

1.1.2.1.1 Chirurgie

La chirurgie est la procédure de choix en cas de tumeurs locales. En effet, la résection de celles-ci par chirurgie peut entraîner une guérison complète du patient. Cependant, cet approche curative entraîne également le retrait d'une marge de tissu sain entourant la tumeur et est très peu appliquée aux métastases. De plus, un risque non négligeable lié à cette stratégie est la dissémination de cellules tumorales, en particulier lorsque la tumeur est située dans la cavité péritonéale. L'approche chirurgicale peut également être utile en adjuvant afin de réduire la taille de la tumeur avant traitement par chimiothérapie et/ou radiothérapie.

1.1.2.1.2 Radiothérapie

La radiothérapie consiste en l'ionisation, par une source extérieure, de l'ADN et de l'eau de la cellule tumorale afin de former des radicaux libres entraînant son apoptose. La lyse tumorale engendrée peut également favoriser la réponse immune anti-tumorale⁸. Cependant, cet effet immunogénique est diminué si le patient est immunodéprimé⁹.

Cette approche peut être exclusive lors de cancer très sensible, tel que les lymphomes, ou adjuvante. La radiothérapie est alors réalisée avant, pendant (lors d'invasion du péritoine) ou après la chirurgie. Dans ce dernier cas, elle peut être effectuée seule, afin de stériliser le lit tumoral, ou en association avec la chimiothérapie.

La difficulté de cette stratégie réside en le ciblage de la tumeur afin de minimiser les évènements secondaires pouvant résulter de l'impact des rayons sur les tissus environnants. Afin de pallier ceci, la radiothérapie n'est utilisée qu'en cas de cancers extérieurs. La toxicité de ce traitement peut toutefois être importante dans ce contexte et survenir de façon aiguë ou retardée. Les symptômes qui en découlent dépendent des organes affectés (poumon, cœur, système digestif, peau, système nerveux...). Les complications hématologiques sont systématiques et amplifiées en cas d'association de la radiothérapie à une chimiothérapie hématotoxique.

Une nouvelle stratégie anti-tumorale de radiothérapie à ciblage spécifique, la curiethérapie, est désormais appliquée au CHUV (Centre Hospitalo-Universitaire Vaudois). La curiethérapie consiste en le positionnement d'un cathéter au site tumoral puis en l'envoi d'un métal radioactif le long de ce dispositif. Cette méthode permet ainsi de cibler spécifiquement la tumeur mais son utilisation est restreinte à certains centres spécialisés.

1.1.2.1.3 Chimiothérapie

La chimiothérapie anti-tumorale, autre stratégie de première ligne, consiste en le traitement des tumeurs par administration de molécules ciblant préférentiellement les cellules se divisant, telles que les cellules tumorales. Leurs effets peuvent être cytotoxiques, entraînant la lyse de ces cellules, ou cytostatiques, aboutissant à l'arrêt de leur croissance. Leur action est focalisée sur l'ADN de ces cellules, mais certaines molécules permettent également de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale⁹. Ces dernières induisent une mort cellulaire immunogénique, c'est-à-dire qu'elles entraînent la libération ou l'exposition d'effecteurs par ou sur les cellules tumorales mourantes. Ces effecteurs favorisent alors la mise en place d'une réponse immune anti-tumorale. Les effets de ces molécules sont ainsi réduits, tout comme la radiothérapie, chez les patients immunodéprimés.

Les chimiothérapies peuvent être utilisées en tant qu'adjuvantes afin d'éradiquer les métastases encore présentes après le traitement local, ou en tant que néo-adjuvantes afin de réduire la taille de la tumeur avant celui-ci.

La principale limitation de cette approche est la survenue d'évènements indésirables importants dépendants de la molécule utilisée. Alors que la toxicité aiguë peut être hématologique, gastro-intestinale, rénale, vésicale, dermatologique, neurologique, allergique, la toxicité chronique touchera plutôt la moelle osseuse, le système nerveux, cardiaque ou pulmonaire, ou encore la fertilité. Le deuxième inconvénient de cette stratégie est la résistance des cellules tumorales, primaire ou acquise, par exercice de pression de sélection sur celles-ci. Des clones résistants à l'action de la molécule administrée peuvent en effet émerger, par exemple par altération de leur métabolisme ou de la cible du médicament ou par diminution de l'influx ou augmentation de l'efflux du médicament dans la cellule.

Afin d'augmenter leur efficacité et de diminuer le risque d'émergence de résistance, les protocoles de chimiothérapie associent des molécules à effets synergiques ou additifs. En particulier, celles-ci sont sélectionnées afin de posséder différents mécanismes d'action ou

différentes cibles, afin d'éviter l'addition voire la synergie des événements indésirables induits.

1.1.2.1.4 Hormonothérapie

Enfin, l'hormonothérapie consiste à bloquer la prolifération des cellules tumorales lorsque celle-ci est hormono-dépendante, lors de certains cancers du sein ou de la prostate par exemple. La molécule administrée au patient peut agir à divers stades, en bloquant la métabolisation des hormones par l'organisme (famille des inhibiteurs de l'aromatase), leur sécrétion (agonistes de la LH-RH, progestatifs lors de cancer du sein ou estrogènes lors de cancer de la prostate) ou encore leur action au niveau du site tumoral (anti-androgènes ou anti-estrogènes périphériques).

Ce traitement n'est en général pas associé à une toxicité de haut grade. Cependant, des effets indésirables invalidants pour le patient adviennent souvent, tels que l'impuissance ou la gynécomastie lors de traitement de cancer de la prostate, ou les bouffées de chaleur et l'arrêt des cycles menstruels pour la thérapie du cancer du sein.

Le choix des stratégies anti-tumorales de première intention dépend du type de cancer, de sa localisation et du patient. Quatre approches peuvent être utilisées et combinées : la chirurgie, la radiothérapie, la chirurgie et l'hormonothérapie. Toutes possèdent une toxicité spécifique, une efficacité très variable ainsi qu'une non spécificité anti-tumorale. Même si le mécanisme d'action de ces thérapies fait parfois intervenir le système immunitaire, leur action principale n'est pas médiée par celui-ci. Considérant l'importance de la réponse immunitaire anti-tumorale dans la prise en charge du cancer, de nouvelles stratégies thérapeutiques se sont développées ces dernières années, regroupées sous le terme d'immunothérapies anti-tumorales.

1.1.2.2. Immunothérapie anti-tumorale

1.1.2.2.1 Principe et classification

L'immunothérapie anti-tumorale consiste en la stimulation *ex vivo* ou *in vivo* du système immunitaire du patient afin d'induire une réponse immune anti-tumorale ou de restaurer son statut immunitaire. Cette stratégie peut être passive, par administration d'anticorps monoclonaux, active, par vaccination thérapeutique spécifique d'antigènes ou administration non spécifique de cytokines ou encore adoptive, par transfert de cellules immunes.

1.1.2.2.2 Immunothérapies passives : Anticorps monoclonaux

L'immunothérapie passive par administration d'anticorps monoclonaux peut agir de différentes manières (Figure 4). L'action anti-tumorale de ce traitement peut être, d'une part, directe, c'est-à-dire induite par fixation de l'anticorps à son antigène cible sans recours à d'autres effecteurs. Cet effet peut être obtenu lors d'utilisation d'anticorps bloquant la signalisation des facteurs de croissance au niveau du site tumoral, tels que le trastuzumab, anticorps dirigé contre le récepteur de type 2 au facteur de croissance épidermique humain (HER2), lors de cancer du sein ou de l'estomac. Le couplage d'anticorps avec des drogues cytotoxiques, des enzymes ou des radioisotopes peut également aboutir à une lyse tumorale directe. En particulier, la *Food and Drug Administration* a récemment approuvé l'utilisation dans le cancer du sein de l'ado-trastuzumab emtansine, anticorps dirigé contre le récepteur HER2 et couplé à un agent inhibiteur des microtubules. L'yttrium-90 ibritumomab tiuxétan, anticorps ciblant le marqueur CD20 à la surface des lymphocytes B et couplé à un isotope radioactif de l'yttrium, possède quant à lui une autorisation de mise sur le marché européenne pour le traitement des lymphomes non Hodgkiniens.

L'administration d'anticorps monoclonaux peut, d'autre part, induire une lyse tumorale indirecte grâce au recrutement d'effecteurs tels que le système du complément ou les cellules du système immunitaire ou encore grâce à l'inhibition de l'immunosuppression exercée par les cellules tumorales. L'utilisation de trois anticorps ciblant des molécules

inhibitrices du système immunitaire exprimées par les tumeurs a ainsi été récemment approuvée pour le traitement du mélanome métastatique chez l'Homme : les anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab), aux États-Unis en 2011 puis en Europe et anti-PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab) au Japon et aux États-Unis. Malgré leur efficacité en traitement seul, associés entre eux ou en combinaison avec d'autres immunothérapies, ces molécules présentent une certaine toxicité. La principale limitation de ce traitement est effectivement l'apparition de phénomènes auto-immuns de grade supérieur ou égal à 3¹⁰.

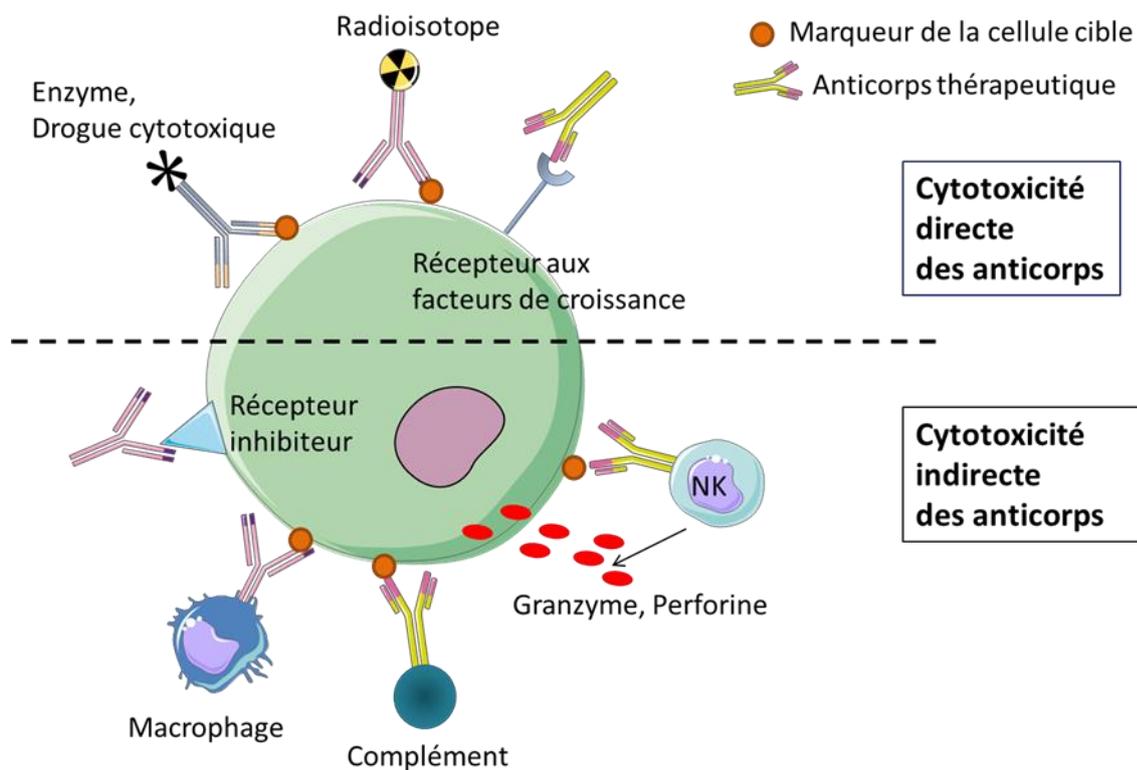


Figure 4. Effets anti-tumoraux des anticorps monoclonaux. Les anticorps monoclonaux administrés lors de protocoles d'immunothérapie anti-tumorale peuvent induire une lyse tumorale de façon directe ou indirecte. La lyse directe fait intervenir des anticorps antagonistes ou agonistes de récepteurs de la cellule tumorale (tels que les récepteurs aux facteurs de croissance) ou des anticorps couplés à des drogues cytotoxiques, des enzymes ou des radioisotopes. La cytotoxicité indirecte des anticorps peut être médiée par le recrutement, par l'anticorps, du système du complément ou d'effecteurs cellulaires tels que les cellules NK et les macrophages mais aussi par blocage de récepteurs inhibiteurs à la surface des lymphocytes T.

1.1.2.2.3 Immunothérapies actives

L'immunothérapie active consiste en l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique, lors de vaccination thérapeutique, ou non spécifique, lors d'administration de cytokines.

1.1.2.2.3.1. Non spécifiques : Cytokines

Certaines cytokines, telles que l'interféron gamma (IFN γ) et l'interleukine 2 (IL-2) peuvent être administrées par voie systémique ou intra-tumorale afin d'augmenter l'activité globale du système immunitaire lors de cancer. Cependant, la toxicité très importante et l'efficacité faible de cette stratégie limitent son utilisation à de très rares cas. L'administration systémique d'interleukine 2 pour le traitement du carcinome rénal métastatique a, par exemple, entraîné la survenue de nombreux effets indésirables de grades 3 et 4 et n'a entraîné que 9% de rémissions complètes chez les 256 patients inclus dans l'essai clinique¹¹. De plus, une conséquence non négligeable de l'administration de l'IL-2 chez le patient est l'activation de ses lymphocytes T régulateurs. En effet, l'IL-2 peut induire l'activation et la prolifération de nombreux lymphocytes, celles-ci étant d'intensité variable selon la présence de récepteurs de forte ou faible affinité à l'IL-2 à la surface de la cellule. Les lymphocytes T régulateurs, en particulier, inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale de l'hôte mais expriment des récepteurs de forte affinité à l'IL-2 à leur surface et peuvent, ainsi, être expandus lors de l'administration systémique d'IL-2.

1.1.2.2.3.2 Spécifiques : Vaccination thérapeutique

Une autre approche de l'immunothérapie active consiste en la vaccination thérapeutique, stratégie induisant le développement d'une réponse cellulaire spécifique anti-tumorale. La vaccination thérapeutique repose sur l'administration d'un antigène tumoral au patient, où il est pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes. Ces dernières génèrent alors des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques qui migrent au site tumoral afin de lyser les cellules cancéreuses portant cet antigène.

Cette approche nécessite l'identification précise d'antigènes tumoraux du patient et le choix de l'antigène à cibler, qui doit être préférentiellement spécifique de la tumeur et visible du système immunitaire lorsqu'exprimé par celle-ci. La réponse cellulaire du patient doit également être de bonne qualité, et un suivi de la réponse tumorale est nécessaire. Enfin, de nombreux systèmes vaccinaux sont désormais à disposition afin d'injecter l'antigène tumoral choisi dans l'organisme. Celui-ci peut ainsi être incorporé dans des vecteurs viraux ou élaboré sous forme d'ADN, de protéine recombinante ou encore de peptide¹².

Cependant, afin d'induire efficacement une réponse immunitaire, la vaccination thérapeutique doit activer la réponse immune innée. À cette fin, des adjuvants peuvent être utilisés, tels que le facteur de croissance des granulocytes et macrophages et l'adjuvant Montanide¹³.

1.1.2.2.4 Immunothérapies adoptives

La dernière catégorie d'immunothérapie anti-tumorale concerne le transfert adoptif de cellules au patient dans le but de stimuler sa réponse immune anti-tumorale. Les cellules transférées peuvent être autologues ou allogéniques. Dans le premier cas, les cellules d'intérêt sont prélevées chez le patient, manipulées *ex vivo* et ré-injectées chez ce même individu, alors que dans le deuxième cas, les cellules administrées au patient sont issues d'un autre individu. Lors de ces deux situations, les cellules font l'objet d'une amplification *in vitro*. Un traitement préalable de déplétion des lymphocytes de l'individu est nécessaire avant un transfert allogénique cellulaire. Ceci permet en effet, de diminuer la compétition des cellules de l'individu receveur pour les cytokines et, ainsi, d'assurer une bonne expansion des cellules transférées.

Les différences majeures de ce type de traitement avec les chimiothérapies est la variabilité importante des protocoles selon le patient lors de transferts autologues, la nécessité de régime immunosuppresseur préalable lors de transferts allogéniques, l'absence de fenêtre thérapeutique et, surtout, la difficulté de maîtrise des événements indésirables. En effet, la toxicité pouvant accompagner le transfert cellulaire est compliquée à enrayer, étant donné la

persistance des cellules dans l'organisme. Enfin, cette stratégie thérapeutique est plus coûteuse que la chimiothérapie et ne peut être proposée que dans des centres hautement spécialisés.

1.1.3 Transferts adoptifs cellulaires anti-tumoraux chez l'Homme

L'immunothérapie adoptive peut ainsi faire intervenir de nombreux acteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative. Les différentes stratégies aujourd'hui utilisées en thérapie anti-tumorale chez l'Homme sont détaillées de façon non exhaustive ci-après.

1.1.3.1. Lymphocytes T $\alpha\beta$

Le transfert adoptif de lymphocytes T $\alpha\beta$ lors de cancer est celui le plus étudié. Ces cellules de l'immunité adaptative ont pour particularité d'exprimer un récepteur TCR (*T-cell Receptor*) reconnaissant un complexe formé par l'association d'un peptide antigénique avec une molécule de la famille du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), de classe I pour les lymphocytes T CD8 ou de classe II pour les lymphocytes T CD4. Cette interaction, si elle s'accompagne de la liaison de co-récepteurs (CD3, CD4, CD8...) et de molécules d'adhésion mais également d'un signal de co-stimulation, entraîne l'activation du lymphocyte spécifique. Ce dernier prolifère et se différencie alors en lymphocyte T cytotoxique en cas d'expression du marqueur CD8 ou, lors de la présence de CD4 à sa surface, en lymphocyte T auxiliaire, soutien de la réponse immune innée et adaptative ou T régulateur, inhibiteur de la réponse immunitaire.

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ administrés chez le patient peuvent être, en premier lieu, issus de son sang périphérique puis activés *ex vivo*. Cependant, un essai clinique de phase I incluant 25 patients atteints de carcinome cellulaire rénal met en évidence le manque d'efficacité de cette stratégie autologue encore peu utilisée. En effet, aucune rémission n'a été observée dans ce protocole lors de co-administration avec l'IL-2, cytokine stimulant la prolifération des

lymphocytes T et favorisant par conséquent la survie et l'expansion des lymphocytes *in vivo*. De plus, la forte toxicité du traitement cytokinique a entraîné la survenue de toxicité de grade 3 chez 6 patients et l'arrêt de celui-ci chez 3 patients¹⁴.

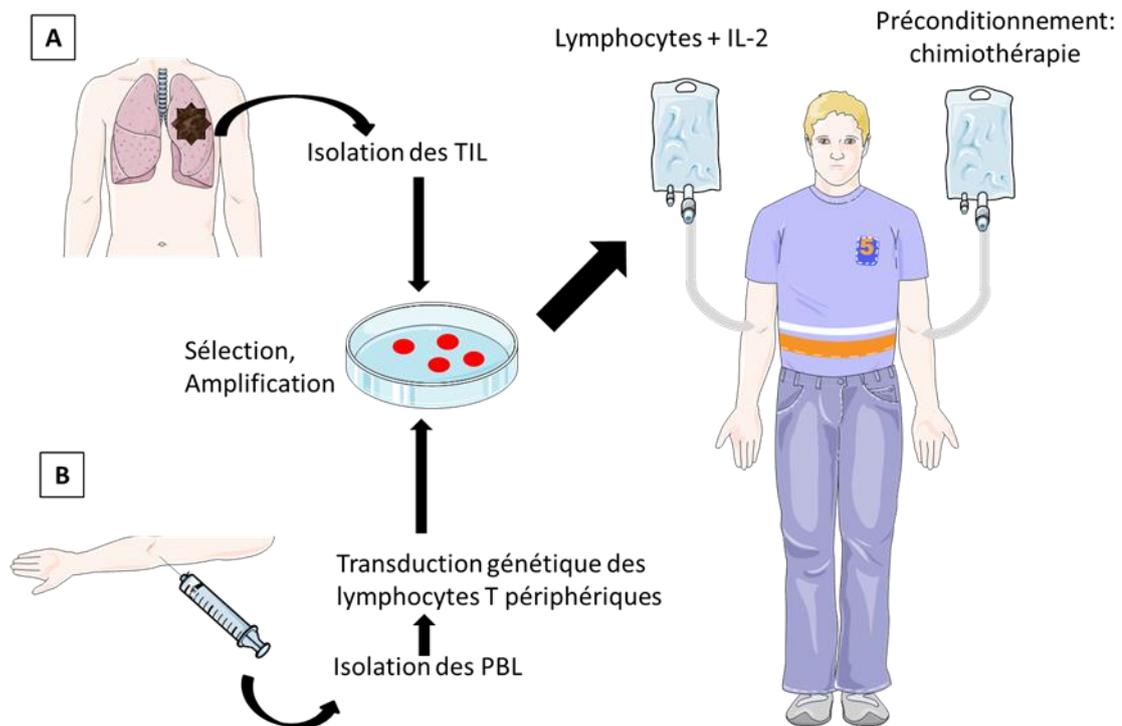


Figure 5. Différentes approches de transfert adoptif anti-tumoral de lymphocytes T.

La première stratégie d'immunothérapie adoptive T chez l'Homme consiste en le transfert au patient de TIL (Lymphocytes infiltrant les tumeurs) autologues par isolation, sélection, amplification *ex vivo* de ses TIL prélevés (A). La seconde approche concerne l'administration au patient de lymphocytes T autologues isolés de son sang périphérique et manipulés génétiquement, sélectionnés et amplifiés *ex vivo* (B). Le transfert des lymphocytes au patient doit être précédé d'un pré-conditionnement lymphodépresseur et accompagné de l'administration d'IL-2.

En second lieu, les lymphocytes transférés peuvent provenir du micro-environnement tumoral du patient (Figure 5). Après prélèvement de ceux-ci, le patient subit une lymphodéplétion afin d'améliorer la persistance des lymphocytes ensuite perfusés et d'enrayer la présence de lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes infiltrant la tumeur (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, « TIL ») autologues sont ensuite administrés de façon systémique avant l'administration d'IL-2 à forte dose. L'intérêt de cette stratégie est son efficacité, en particulier dans le cadre du mélanome, où elle a engendré lors d'un essai clinique une rémission chez 50% des patients et une stabilisation de la maladie chez 20% des patients¹⁵. Ses principaux inconvénients restent toutefois sa toxicité importante liée à la

chimiothérapie non myéloablative et à l'administration d'IL-2, ainsi que la difficulté et le coût d'isolation d'un nombre suffisant de TIL chez l'individu. Des perspectives d'évolution de cette stratégie sont l'association de ce traitement à d'autres thérapies anti-tumorales inhibant l'immunosuppression et la modification génétique des TIL afin d'améliorer leur survie ou leur migration lors de leur perfusion. Il a notamment été démontré que la transduction de TIL par CXCR2, un récepteur aux chimiokines, améliore leur migration vers le site tumoral et leur activité tumorale lors de leur transfert chez des souris greffées par des cellules de mélanome exprimant CXCL1, ligand de CXCR2¹⁶.

Troisièmement, les lymphocytes T transférés au patient peuvent subir le transfert génique *ex vivo* d'un récepteur TCR reconnaissant un antigène tumoral afin de moduler leur spécificité et, par conséquent, de leur permettre de reconnaître les cellules tumorales (Figure 5). Robbins et al. ont prouvé l'efficacité de ce traitement grâce à la rémission de 9/17 patients atteints de mélanome métastatique ou de sarcome cellulaire synovial¹⁷. Ceux-ci ont tous été traités par des lymphocytes autologues manipulés afin d'exprimer un TCR spécifique de NY-ESO-1, antigène exprimé par leurs cellules tumorales. Ce traitement est ici encore associé à une lymphodéplétion préalable et à l'administration systémique d'IL-2. Cependant, cette approche peut engendrer d'importantes manifestations auto-immunes à cause de la présence du TCR natif sur le lymphocyte mais surtout de l'absence d'éducation thymique de ces lymphocytes. En effet, lors de leur différenciation, les lymphocytes T naturellement présents dans l'organisme ont tous subi une éducation thymique, durant laquelle les cellules trop affines pour un antigène du soi ont été éliminées, afin d'éviter tout processus d'auto-immunité, c'est-à-dire de lyse de cellules saines de l'organisme par des cellules du soi. Les lymphocytes autologues manipulés génétiquement et administrés chez le patient subissent cette éducation thymique pour les TCR du soi mais non pour les TCR transférés. Les lymphocytes manipulés génétiquement présentant alors une affinité trop forte à cause de leur nouveau TCR ne sont alors pas éliminés par ce processus et peuvent entraîner l'apparition d'auto-immunité chez le patient. Ce phénomène est par exemple apparu lors du développement de colite inflammatoire auto-immune chez tous les patients atteints d'adénocarcinome colorectal traités par transfert de lymphocytes T $\alpha\beta$ autologues transduits par un TCR spécifique de l'antigène carcino-embryonique, glycoprotéine exprimée par leurs cellules tumorales¹⁸.

Afin de pallier à cette auto-immunité tout en conservant l'efficacité du traitement, le développement d'une nouvelle stratégie est actuellement en cours. Celle-ci consiste en la transduction *ex vivo* par un TCR de cellules souches hématopoïétiques du patient. Ces cellules manipulées génétiquement sont ensuite ré-administrées chez le patient, où elles se différencient en lymphocytes T. Les lymphocytes T générés conservent la spécificité de leur précurseur mais ont subi une éducation thymique lors de leur différenciation, éliminant ainsi les lymphocytes T dérivés des cellules souches hématopoïétiques transduites avec des TCR trop affins pour des antigènes du soi. L'application de cette stratégie dans un modèle murin de mélanome a démontré l'équivalence d'efficacité de ce traitement par rapport au transfert adoptif de lymphocytes T directement transduits par un TCR¹⁹.

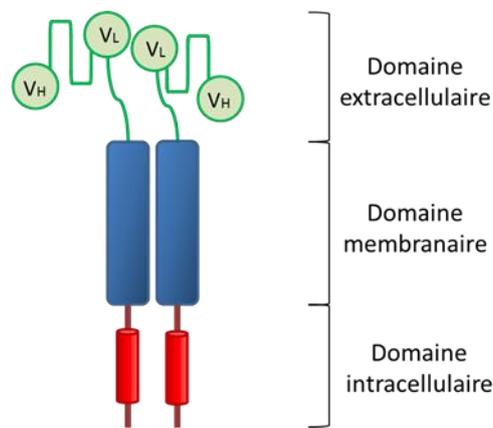


Figure 6. Représentation schématique d'un récepteur antigénique chimérique CAR.

Les récepteurs antigéniques chimériques CAR sont constitués d'un domaine extracellulaire interagissant avec l'antigène cible et composé de régions variables (VH, VL) ainsi que d'un domaine intracellulaire contenant un ou plusieurs domaines de signalisation (cylindres rouges).

Dernièrement, l'immunothérapie adoptive T $\alpha\beta$ peut consister en le transfert de lymphocytes T $\alpha\beta$ autologues transduits *ex vivo* par un récepteur antigénique chimérique (CAR). Ce récepteur est une molécule de fusion portant deux domaines (Figure 6). Le domaine extracellulaire comprend une chaîne unique à fragments variables dérivée d'un anticorps et interagit avec l'antigène cible indépendamment des molécules du CMH. Le domaine intracellulaire, quant à lui, est composé de modules de signalisation. L'activation des lymphocytes transduits par un CAR n'étant pas restreinte au CMH, ces cellules restent actives lors de diminution d'expression des molécules du CMH par les cellules tumorales. Cependant,

leur activité et leur survie restent dépendants *in vivo* de leur application. En effet, bien que le transfert de lymphocytes T exprimant des CAR anti-CD19 ait déjà prouvé son importante efficacité dans la thérapie des pathologies malignes B^{20,21}, l'efficacité de l'administration de lymphocytes T transduits par des CAR chez des patients atteints de neuroblastome reste limitée²². Ainsi, des essais étudient l'influence de l'ajout de certains domaines de signalisation au récepteur CAR sur l'efficacité de ces cellules^{23,24}, en particulier lors de cancer ovarien. La persistance des lymphocytes transférés dans la circulation périphérique peut finalement être augmentée chez les patients atteints de neuroblastome lorsque la transduction de CAR est effectuée sélectivement, *ex vivo*, dans des lymphocytes T autologues spécifiques du virus Epstein-Barr²².

1.1.3.2 Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ ne sont cependant pas les seuls lymphocytes T à être utilisés en immunothérapie adoptive. L'efficacité du transfert adoptif de lymphocytes T $\gamma\delta$, lymphocytes non conventionnels du système immunitaire inné, en tant que thérapeutique anti-tumorale a également été examinée chez l'Homme. La particularité de ces cellules est leur rapidité de réponse suite à un stress cellulaire, grâce à leur état de pré-activation directement après différenciation, contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$ qui doivent préalablement être activés et se différencier en cellules T effectrices. S'ajoutent à cette qualité leur mémoire antigénique et, surtout, leur tropisme tissulaire. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ résident en effet en majorité dans les épithéliums hépatiques, cutanés, digestifs et respiratoires. Ils reconnaissent, selon leur tropisme, des antigènes conservés non peptiques exprimés par des cellules soumises à un stress grâce à leurs récepteurs NKG2D, TLR (*Toll-Like Receptor*), Dectin-1 et TCR (*T-cell Receptor*) (Figure 7). Leur activation conduit à la lyse directe tumorale mais également au recrutement de lymphocytes T cytotoxiques et à la maturation des cellules dendritiques. Trois familles de lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été découvertes chez l'Homme : les lymphocytes V δ 1, présents dans le thymus et la rate, V δ 2, circulant dans le sang périphérique et ainsi facilement accessibles et V δ 3 tapissant en majorité la muqueuse digestive.

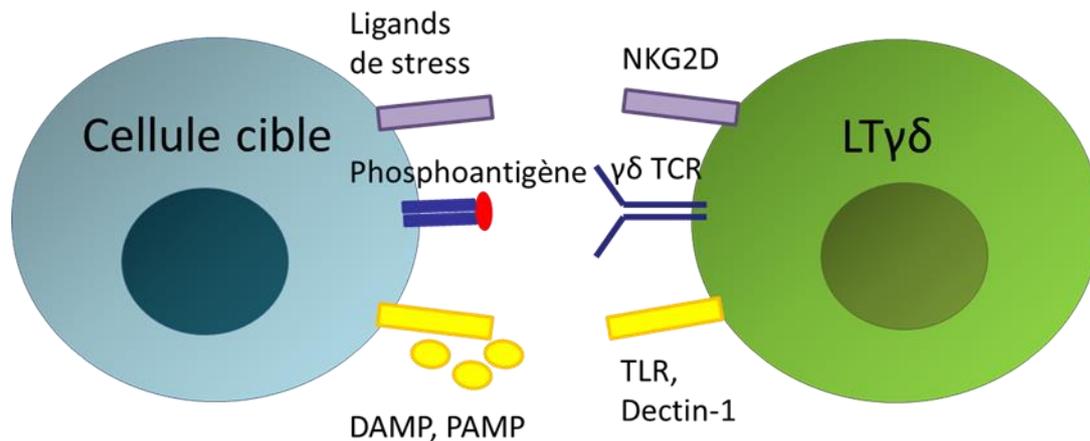


Figure 7. Reconnaissance de cellules cibles par les lymphocytes $\gamma\delta$.

Les lymphocytes peuvent reconnaître par trois mécanismes des signaux de danger exprimés par des cellules cibles: *via* leurs TCR à spécificité phosphoantigénique, *via* NKG2D, dont les ligands sont induits par le stress et, enfin, *via* leur TLR et Dectin 1 qui reconnaissent des motifs moléculaires associés au danger (DAMP) ou aux pathogènes (PAMP).

Le transfert de ces cellules lors de cancer peut être autologue ou allogénique. Dans le premier cas, des lymphocytes $V\delta 2$ sont obtenus par prélèvement de sang, activés *ex vivo* et co-administrés lors de plusieurs cycles par voie systémique chez le patient avec du zolédronate, agoniste du TCR $V\gamma\delta 2$ activant ces lymphocytes. Cependant, ce traitement reste d'efficacité modérée dans les divers essais cliniques réalisés. En contexte de carcinome cellulaire rénal métastatique, seulement 1 patient sur 11 a expérimenté une rémission clinique²⁵. Lors de myélome multiple, 2 patients sur 6 ont continué à voir augmenter leur concentration sérique en protéines de Bence-Jones²⁶ et, finalement, 3 patients sur 8 affectés par un cancer du poumon non à petites cellules ont vu leur maladie se stabiliser mais où aucune rémission n'a été observée²⁷. Différentes stratégies d'expansion de ces lymphocytes *ex vivo* ont ainsi vu le jour afin d'améliorer l'efficacité de ce traitement chez l'Homme^{28,29}. Un important problème dans le suivi des patients est l'absence de corrélation entre l'accumulation des lymphocytes $T\gamma\delta$ perfusés dans le sang et l'efficacité clinique²⁷. En effet, ces cellules migrent rapidement après administration systémique vers le poumon puis vers le foie et la rate mais ne persistent pas dans la circulation périphérique. La migration de ces cellules vers le site tumoral et l'efficacité qui en découle est cependant variable selon les patients et le type de cancer³⁰, soulignant l'intérêt du suivi de la migration de ces cellules chez les patients par imagerie.

Le transfert de lymphocytes T $\gamma\delta$ peut également être allogénique, par enrichissement des éléments mononucléés du sang (PBMC) d'un individu en ce type cellulaire. La co-administration d'IL-2 et de zolédronate avec ce mélange cellulaire enrichi allogénique a permis la rémission, par exemple, de 3 patients sur 4 atteints d'hémopathies malignes avancées lors d'une essai clinique³¹.

Deniger et al. ont enfin récemment démontré le rationnel de l'utilisation de lymphocytes T $\gamma\delta$ exprimant un récepteur antigénique chimérique (CAR) en thérapie cellulaire anti-tumorale³². En effet, le transfert de CAR ciblant l'antigène CD19 dans des lymphocytes T $\gamma\delta$ a permis, dans cette étude, d'obtenir des lymphocytes bi-spécifiques. Ces derniers peuvent ainsi répondre *in vitro* à l'interaction avec la cible de leur récepteur TCR $\gamma\delta$ mais aussi à la liaison de leur récepteur CAR avec l'antigène CD19 présent sur les cellules tumorales à éliminer, entraînant ainsi une lyse tumorale *in vivo* dans un modèle murin.

1.1.3.3 Cellules NKT

La troisième stratégie d'immunothérapie adoptive ici détaillée s'applique aux cellules NKT (*Natural Killer T cell*: Cellules tueuses naturelles T). Celles-ci appartiennent au système immunitaire adaptatif et sont à l'interface entre les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes T $\alpha\beta$. En effet, leur TCR est de type $\alpha\beta$ mais semi-invariant car reconnaissant des (glyco)lipides présentés par le récepteur cellulaire de surface CD1d de façon CMH-indépendante. Outre leur important rôle au sein de la réponse immune anti-tumorale par recrutement d'effecteurs innés et adaptatifs *via* la production rapide et importante d'IFN γ , les cellules NKT sont également adjuvants de la maturation des cellules dendritiques.

Les seuls essais cliniques réalisés concernent le transfert de PBMC autologues enrichies *ex vivo* en cellules NKT. Des études de phase I ont ainsi permis de démontrer la faisabilité de ce traitement, sa très faible toxicité et sa potentielle efficacité, grâce à la rémission clinique de 3/8 patients atteints de carcinome tête et cou et la stabilisation de la maladie de 4/8 patients atteints de ce cancer et de 4/6 patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules dans deux essais cliniques^{33,34}. Cependant, même si le transfert adoptif

systemique seul de cellules NKT permet leur augmentation dans le sang periphérique de ces patients, celle-ci est plus fréquente lors de co-administration avec des cellules presentatrices d'antigenes manipulées *ex vivo* afin de presenter l'antigène α -Galactosile ceramide, agoniste des cellules NKT.

La principale limitation de cette strategie est la tres faible frequence des cellules NKT dans le sang periphérique chez l'Homme. Malgre l'etape d'enrichissement *in vitro*, le melange cellulaire administre au patient a en effet contenu, dans ces deux protocoles, 0.3 à 21.5% de cellules NKT. Une des perspectives d'amelioration de cette strategie est la generation de cellules NKT par differentiation de cellules souches pluripotentes induites³⁵. Heckzey et al. ont recemment prouve la faisabilite de la transduction retrovirale, dans des cellules NKT, d'un recepteur CAR specifique du marqueur GD2 exprime par les cellules tumorales lors de neuroblastome³⁶. Ces cellules NKT peuvent ainsi *in vivo* induire l'expression de cytokines telles que l'interferon gamma. Quant à l'efficacite de ces cellules, leur transfert chez des souris greffees avec des cellules de neuroblastome metastatiques a permis de retarder l'apparition de metastases.

1.1.3.4 Cellules NK

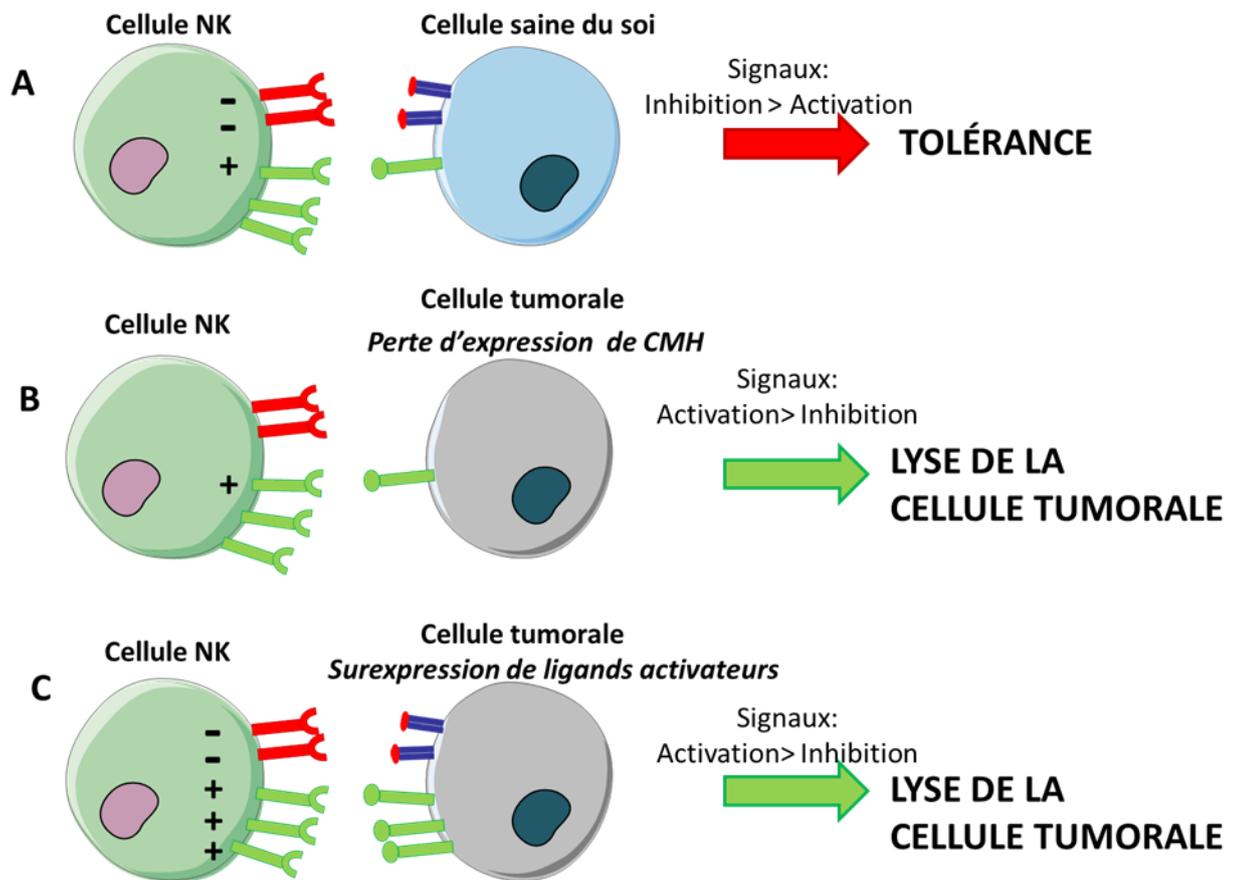


Figure 8. Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK.

Les cellules NK sont tolérantes envers les cellules saines de l'hôte car les signaux inhibiteurs reçus sont plus forts que les signaux activateurs (a). Les cellules tumorales peuvent perdre l'expression de molécules du CMH et ainsi diminuer les signaux inhibiteurs reçus par les cellules NK qui deviennent alors actives (b). Les cellules tumorales peuvent enfin surexprimer des ligands de stress activateurs des cellules NK. Les signaux activateurs sont alors plus forts que les signaux inhibiteurs et les cellules NK deviennent activées (c). L'activation des cellules NK (b et c) aboutit à la lyse tumorale.

Les cellules NK sont des effecteurs innés de la réponse immunitaire n'exprimant ni BCR ni TCR et récemment regroupées dans la famille des cellules lymphoïdes innées (cf 2.1). Les principaux avantages de ces cellules, par rapport aux lymphocytes T, sont la plus forte proportion de cellules répondeuses, la mise en place immédiate de la réponse effectrice et la reconnaissance de l'état pathologique de la cellule. Les cellules NK, en effet, expriment à leur surface un panel de récepteurs activateurs ou inhibiteurs. Leur activation est ainsi déterminée par la balance entre la stimulation de ces deux types de récepteurs (Figure 8). Les récepteurs inhibiteurs peuvent, en particulier, se lier aux molécules du CMH présentes sur les cellules

cibles, tandis que ces dernières peuvent exprimer des ligands activateurs interagissant avec les récepteurs activateurs des cellules NK. Ces cellules ne seront alors activées que si la signalisation induite par les récepteurs activateurs est plus forte que celle induite par les récepteurs inhibiteurs, c'est-à-dire lorsque la cellule cible exprime faiblement ou de façon nulle des molécules de CMH et/ou fortement des ligands activateurs.

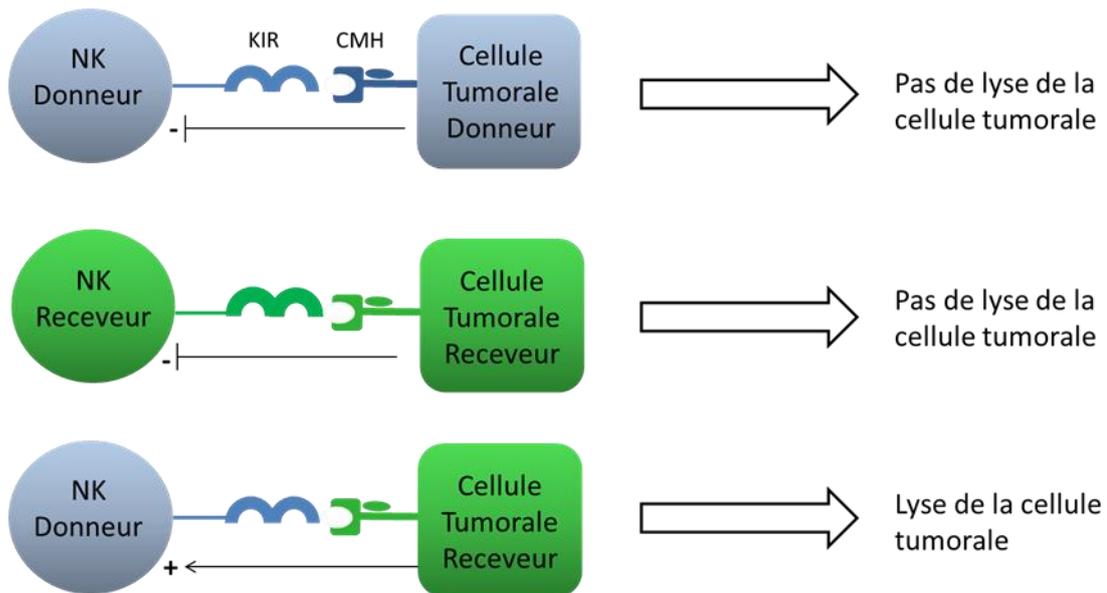


Figure 9. Intérêt de l'utilisation d'incompatibilités KIR en thérapie anti-tumorale.

Les cellules NK reçoivent un signal inhibant leur fonction lors de l'interaction de leurs récepteurs KIR inhibiteurs avec les molécules du CMH-I correspondantes exprimées par les cellules tumorales du même individu. Lors de mismatch entre le génotype KIR du receveur et du donneur, les molécules du CMH exprimées par les cellules tumorales sont ainsi ligands des KIR du receveur et non du donneur. Aucun signal d'inhibition n'est ainsi transféré aux cellules NK du donneur, qui peuvent alors lyser les cellules tumorales.

La capacité fonctionnelle des cellules NK est soumise à un processus de régulation strict, le *licensing*³⁷. En effet, celles-ci n'acquièrent leur capacité lytique que lorsqu'elles ont rencontré un ligand du CMH lors de leur éducation. Les cellules NK d'un individu A sont alors éduquées afin de ne pas lyser ses cellules, mais peuvent induire l'apoptose des cellules d'un individu B si celui est haplo-identique, c'est-à-dire ne possède pas les mêmes molécules du CMH à la surface de ses cellules que l'individu A (Figure 9).

Cependant, une levée d'inhibition des cellules NK peut s'exercer vis-à-vis des cellules tumorales grâce à la diminution de leur expression des molécules du CMH et l'augmentation de celle des ligands activateurs. Les cellules NK peuvent ainsi être activées et lyser les

cellules tumorales de l'hôte grâce à la sécrétion de cytokines et chimiokines mais aussi de façon directe grâce à la production de perforine et de granzyme. La perforine forme des pores dans la paroi de la cellule cible grâce auxquels la granzyme rentre et induit l'apoptose de cette cellule. Les récepteurs de mort cellulaire présents à la surface des cellules NK peuvent également être activés si leurs ligands sont présents sur la cellule tumorale et induire l'apoptose de cette dernière. Enfin, le dernier mécanisme de lyse tumorale directe des cellules NK concerne la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps « ADCC » (*Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*), consistant en la liaison de celles-ci, *via* des récepteurs de type Fc, à un anticorps fixé à la cellule tumorale, aboutissant à leur activation. Les cellules NK sont également connues pour stimuler la réponse immunitaire en contexte tumoral, en particulier grâce au recrutement d'effecteurs de l'immunité adaptative et à la régulation de l'activité des cellules dendritiques en leur fournissant des débris antigéniques tumoraux.

De nombreux essais cliniques se sont intéressés au transfert de ces acteurs cellulaires dans le cadre du cancer. Les cellules NK utilisées à ce dessein sont allogéniques car les cellules NK autologues, malgré leur persistance à long terme dans le sang périphérique, ne possèdent pas d'efficacité clinique. Parkhurst et al., par exemple, ont illustré ceci dans un essai clinique incluant 8 patients atteints de mélanome et de carcinome cellulaire rénal, rejoignant le concept de *licensing* expliqué ci-dessus³⁸.

La thérapie cellulaire anti-tumorale par administration de cellules NK est toujours associée à la co-administration d'IL-2 afin de favoriser la persistance périphérique de ces cellules, mais également à une lymphodéplétion préalable du patient. L'efficacité de cette méthode a été observée dans divers cancers, tels que les cancers de l'ovaire et du sein, où 4 patients sur 20 ont expérimenté une rémission partielle clinique de leur maladie et 12 patients sur 20 ont vu leur maladie stabilisée. Cependant, cet essai clinique a reporté de fortes toxicités liées à ce traitement, probablement dues à la mauvaise purification cellulaire. En effet, le mélange administré aux patients ne contenait que 25% de cellules NK, le reste étant en majorité des lymphocytes B (20%) et des monocytes (44%)³⁹. La toxicité de cette stratégie est au contraire faible lorsque le procédé de purification des PBMC du donneur est réalisé avec soin, même chez de jeunes patients^{40,41,42}.

La sélection d'un donneur haplo-identique a démontré un fort intérêt dans la leucémie aiguë myéloïde chez des patients à haut risque, confortant le concept de *licensing*. En effet, Curti et al. ont observé une rémission chronique chez 3 patients sur 5 à maladie active ou en rechute moléculaire avant inclusion dans l'étude⁴¹. Enfin, le cancer du poumon non à petites cellules semble également répondre à ce traitement. Un essai clinique de phase I incluant 15 patients a ainsi démontré une tendance d'augmentation de la survie totale et de la survie sans progression et 2 rémissions partielles et 6 stabilisations de maladie suite à cette thérapie⁴².

Différentes pistes d'amélioration de l'efficacité de ce protocole sont également en cours d'investigation. Tout d'abord, l'utilisation de la lignée cellulaire NK-92 pourrait améliorer l'efficacité de ce traitement et son innocuité. En effet, ces cellules NK, issues d'un patient à lymphome non Hodgkinien, sont dépendantes à l'IL-2, ne possèdent pas de KIR à leur surface et sont cytotoxiques envers un large panel de pathologies maligne. De plus, la constance de la source de ces cellules permettrait de s'affranchir des variations dues au donneur, potentiellement génératrices de toxicité chez le receveur. Arai et al. ont récemment démontré leur faible toxicité lors de cancer rénal et de mélanome métastatique⁴³.

Administrer les cellules NK allogéniques par voie locale et non systémique pourrait également diminuer la toxicité de ce transfert et, par conséquent, permettre d'augmenter le nombre de cellules transférées afin d'améliorer son efficacité. L'activité anti-tumorale de cellules NK de donneurs humains administrées en intra-péritonéal chez des souris à cancer ovarien prouve l'intérêt de l'exploration de cette voie chez l'Homme³⁹.

L'association du transfert de cellules NK avec la régulation de la présence d'autres effecteurs immuns est ensuite actuellement étudiée et présente de nombreux intérêts. En premier lieu, la co-administration avec des cellules dendritiques préalablement activées par des cellules tumorales nécrotiques améliore chez les souris la distribution tissulaire et la cytotoxicité des cellules NK perfusées. Cette thérapie combinée est plus efficace que l'administration seule de cellules NK pour la diminution des métastases pulmonaires et l'induction de mémoire anti-tumorale à long terme dans un modèle murin de mélanome⁴⁴. L'ajout de lymphocytes T cytotoxiques dans le mélange cellulaire perfusé au patient permet, en second lieu, d'augmenter la survie globale des patients atteints de cancer du poumon par rapport à ceux ne recevant pas de thérapie cellulaire⁴⁵. La déplétion des lymphocytes T régulateurs est troisièmement utilisable en complément du transfert de cellules NK chez l'Homme et

nécessite seulement l'administration d'un agent anti-néoplasique, le cyclophosphamide ou l'Ontak. Les bénéfices de cette méthode portent sur l'amélioration de l'expansion des lymphocytes T spléniques anti-tumoraux induite par les cellules NK chez les souris⁴⁶.

Des récepteurs antigéniques chimériques (CAR) peuvent également être transférés dans les cellules NK afin d'augmenter leur capacité lytique envers une cible tumorale. Ainsi, CHU et al. ont démontré l'intérêt de l'utilisation de cellules NK exprimant un CAR anti-CS1 dans le myélome multiple⁴⁷. Ces cellules induisent en effet une meilleure lyse *in vitro* des cellules tumorales CS1⁺ ainsi qu'une meilleure survie de souris greffées avec des cellules tumorales CS1⁺ que les cellules NK non transduites par ce CAR.

Enfin, la meilleure exploitation d'incompatibilités de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) entre le donneur et le receveur, la pré-activation des cellules NK avant leur transfert pour augmenter leur capacité lytique mais aussi l'adaptation de la spécificité tissulaire des cellules NK prélevées chez le donneur au type de cancer à traiter devraient permettre l'amélioration de l'efficacité déjà intéressante du transfert adoptif anti-tumoral des cellules NK chez l'Homme⁴⁸.

1.1.3.5 Cellules dendritiques

Le transfert de cellules dendritiques est également appliqué chez l'Homme en tant qu'immunothérapie anti-tumorale. Les sous-populations de cellules dendritiques diffèrent tout d'abord selon le tissu. Malgré la présence de seulement deux sous-types dans le sang et les organes lymphoïdes, *e.g* les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes, la peau et les muqueuses hébergent, par exemple, les cellules de Langerhans, encore différentes des autres sous-types présents dans le derme et les sous-muqueuses.

Les cellules dendritiques, bien qu'appartenant à l'immunité innée, participent à l'instauration d'une réponse immune adaptative. En effet, les cellules dendritiques myéloïdes présentent des antigènes aux lymphocytes T naïfs et les activent, induisant leur différenciation et prolifération. La cytotoxicité des cellules dendritiques peut être directe ou indirecte. La cytotoxicité directe fait intervenir des voies telles que celle des récepteurs de mort cellulaire

ou celle médiée par la perforine et le granzyme⁴⁹. La cytotoxicité indirecte, au contraire, implique la sécrétion d'interférons de type 1 par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, qui stimule ainsi la cytotoxicité des cellules NK et la maturation des cellules dendritiques myéloïdes. Les cellules dendritiques immatures captent effectivement les antigènes dans les tissus, alors que leur maturation leur permet d'acquérir un phénotype de présentation d'antigène et de migrer vers les organes lymphoïdes afin d'y activer des lymphocytes T spécifiques.

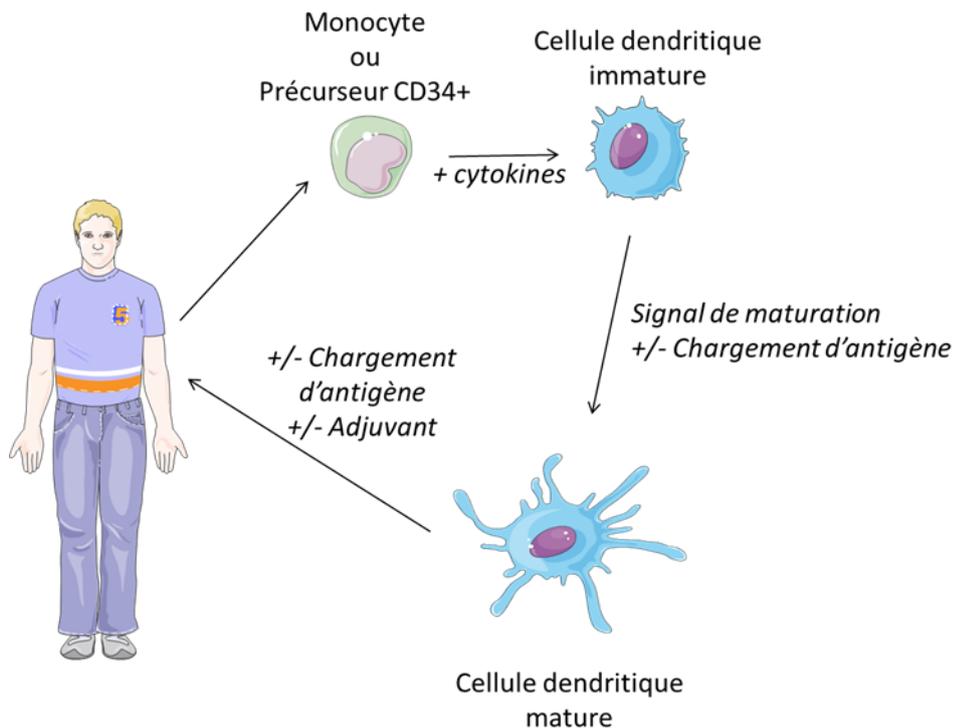


Figure 10. Étapes du transfert adoptif de cellules dendritiques chez l'Homme.

Une cytophérèse permet d'isoler chez le patient des monocytes ou des précurseurs CD34⁺. Ces cellules sont ensuite cultivées en présence de diverses cytokines afin de produire des cellules dendritiques immatures et chargées par des antigènes avant ou après leur maturation.

Le transfert adoptif de cellules dendritiques est majoritairement autologue mais fait intervenir différents sous-types cellulaires (Figure 10). En effet, ces cellules peuvent être différenciées *in vitro* à partir de monocytes ou de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ prélevés chez le patient. Tandis que la première méthode est celle la plus couramment utilisée, Romano et al. ont récemment démontré une supériorité d'efficacité des cellules de Langerhans différenciées à partir de progéniteurs CD34⁺ par rapport aux cellules dendritiques

dérivées de monocytes pour l'induction d'une réponse lymphocytaire T cytotoxique dans le cadre du traitement du mélanome⁵⁰.

Les cellules dendritiques transférées lors de cette approche ont ainsi été différenciées *in vitro* à partir de précurseurs prélevés chez le patient, mais peuvent également être chargées *in vitro* par des peptides tumoraux afin d'augmenter leur cytotoxicité anti-tumorale (Figure 10). Les peptides utilisés peuvent être spécifiquement associés à la tumeur⁵¹ ou simplement issus du lysat tumoral^{52,53}. Des adjuvants tels que l'acide polyinosinique-polycytidylique peuvent également être co-administrés chez le patient afin d'augmenter leur efficacité^{51,52,54}.

De nombreuses voies d'administration de ces cellules ont été testées, telles qu'une injection intraveineuse⁵⁵, intraveineuse puis intradermique⁵⁶, intratumorale⁵¹, intratumorale puis intradermique⁵², sous-cutanée⁵⁷ ou intradermique seule. En particulier, le défi des injections intradermiques consiste en la bonne migration des cellules administrées vers les nœuds lymphatiques, nécessaire à leur fonction de présentation d'antigène. Cependant, ce processus migratoire semble amélioré lors de la diminution de la proportion des cellules dendritiques injectées⁵⁴. Malheureusement, l'accumulation intra-tumorale des cellules dendritiques n'est pas documentée dans les essais reportés.

Cette stratégie a été explorée dans de nombreuses indications, telles que le gliome^{51,52}, le mélanome^{49,50,58}, le cancer du sein⁵⁹, le cancer du côlon⁵⁶ et le lymphome B non Hodgkinien⁵⁵. Malgré sa très faible toxicité, ce type d'immunothérapie possède cependant une efficacité limitée. En effet, pas de manifestations auto-immunes et peu d'évènements indésirables de grade 3 ou supérieur ont été reportés ces dernières années, mais aucune supériorité clinique par rapport à la dacarbazine, molécule utilisée couramment en chimiothérapie, n'a pu être prouvée dans le cadre du mélanome métastatique⁵⁷. Cependant, le transfert de cellules dendritiques autologues, « Sipuleucel-T » a été approuvé récemment en Europe pour le traitement du cancer de la prostate métastatique réfractaire à l'hormonothérapie.

Afin d'améliorer son efficacité, le transfert adoptif de cellules dendritiques peut être associé à une thérapie intraveineuse par radiations dans le cadre de métastases osseuses multiples⁵³ ou à un transfert de lymphocytes T autologues intra-tumoraux⁶⁰. Néanmoins, même si cette dernière approche a induit la rémission d'un patient sur 8 et de très faibles toxicités, son efficacité est restée faible dans le cadre du mélanome métastatique. Enfin, Nair et al et van Nuffel et al. ont démontré la faisabilité de l'introduction d'ARN issu de la tumeur dans les cellules dendritiques transférées, respectivement par transfection ou électroporation^{56,61}. Cette méthode pourrait ainsi constituer une nouvelle voie d'amélioration de cette thérapeutique.

1.1.3.6 Macrophages

Autres acteurs de l'immunité innée, les macrophages ont également été utilisés lors d'essais cliniques de thérapie adoptive anti-tumorale. Ces cellules, peuvent présenter des antigènes, comme les cellules dendritiques. Alors que les macrophages inactivés sont essentiellement présents dans la circulation périphérique et les tissus périphériques afin de jouer le rôle de sentinelles et capter des antigènes, leur activation par des signaux de danger et l'aide apportée par les lymphocytes T les fait migrer dans les tissus périphériques et les organes lymphoïdes secondaires.

Les macrophages se différencient majoritairement à partir des monocytes et incluent 2 catégories cellulaires à différents profils cytokiniques et fonctions. Les macrophages de type 1 sont spécialisés dans la phagocytose et peuvent induire une lyse tumorale. Au contraire, les macrophages de type 2, grâce à la sécrétion d'IL-10 et TGF- β , régulent la phase tardive de l'inflammation en limitant la réponse inflammatoire et en induisant une réparation tissulaire⁶². Les macrophages associés aux tumeurs, c'est-à-dire ceux présents dans le micro-environnement tumoral sont majoritairement de type 2.

De nombreuses études cliniques ont été menées avant les années 2000 afin d'étudier l'intérêt du transfert adoptif de macrophages chez des patients atteints de cancers tels que le

cancer colorectal, rénal, pancréatique, pulmonaire non à petites cellules, ovarien, de l'estomac, de la trompe de Fallope et le mélanome^{63,64}. Les macrophages administrés étaient obtenus à partir de prélèvement sanguin de PBMC du patient et activés ou non *in vitro* avant leur transfert par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. Ce traitement, bien qu'à toxicité très modérée, a conduit lors de transfert d'importantes quantités de macrophages à de sévères hypotensions, réduites lors de pré-traitement des patients par ibuprofène. Cependant, les résultats de ces deux essais cliniques ici détaillés sont restés mitigés. En effet, aucune régression tumorale n'a été observée et seulement 11 à 20% des patients ont pu voir leur maladie se stabiliser, malgré la confirmation *in vitro* de la capacité cytotoxique anti-tumorale des macrophages administrés.

Récemment, une équipe parisienne a de nouveau testé l'efficacité anti-tumorale du transfert adoptif de macrophages autologues chez l'Homme mais, cette fois, dans le cadre du cancer de la vessie et par administrations intra-vésicales répétées⁶⁵. Leurs résultats très prometteurs permettent d'envisager l'intérêt de cette stratégie en thérapeutique anti-tumorale. En effet, seulement 8 patients sur 17 ont subi une récurrence tumorale dans l'année suivant leur première instillation de macrophages et très peu d'évènements indésirables ont été relevés, tous de grade inférieur ou égal à 2.

1.1.3.7 Autres stratégies en cours d'investigation pré-clinique

Toutes les stratégies adoptives anti-tumorales détaillées précédemment ont été testées dans des essais cliniques et ont démontré un rapport efficacité/toxicité plus ou moins satisfaisant selon le protocole et le type cellulaire utilisés. Mais d'autres approches sont actuellement en cours d'investigation pré-clinique et pourraient représenter de nouvelles perspectives de thérapie anti-tumorale chez l'Homme.

1.1.3.7.1 Lymphocytes B

Les lymphocytes B, cellules présentatrices d'antigènes de l'immunité adaptative, semblent prometteurs en tant qu'acteurs de la thérapie adoptive anti-tumorale. Ces lymphocytes expriment à la surface le récepteur BCR (*B-Cell Receptor* : Récepteur aux lymphocytes B), composé d'une immunoglobuline de surface à spécificité antigénique unique. Ces lymphocytes peuvent se différencier, sous l'effet de signaux d'activation nécessitant ou non des lymphocytes T (activation dite « thymo-dépendante » ou « thymo-indépendante »), en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Le transfert de lymphocytes B et/ou de lymphocytes T issus des ganglions lymphatiques drainant les tumeurs a tout d'abord été étudié dans des modèles murins de carcinome mammaire, de mélanome et de fibrosarcome^{66,67}. L'obtention de ces cellules s'effectue par isolation à partir des ganglions lymphatiques drainant les tumeurs collectés chez les souris après inoculation sous-cutanée des lignées tumorales chez ces animaux. Les lymphocytes B purifiés induisent bien une lyse tumorale indirecte *in vitro*. L'activation et l'expansion *in vitro* de ces cellules précèdent ensuite leur transfert intraveineux et l'administration systémique d'IL-2 chez des souris possédant des métastases pulmonaires issues de la même lignée tumorale primitive que celle inoculée précédemment en sous-cutanée. La mise en œuvre de ce protocole a ainsi abouti à une augmentation de la réponse lymphocytaire T spécifique anti-tumorale chez les souris traitées et à une régression des métastases dont l'intensité augmente lors de co-administration avec les lymphocytes T issus

des ganglions. Cependant, le transfert seul des lymphocytes B s'est avéré incapable de contrôler la croissance de tumeurs sous-cutanées.

Moutai et al. ont démontré l'efficacité anti-tumorale de l'administration de lymphocytes B « *Germinal center-like* » dans un modèle murin tumoral lorsque la tumeur exprime le même antigène que celui reconnu par ces cellules⁶⁸. Le processus d'obtention de ces cellules est cependant complexe. La première étape consiste en l'insertion d'un gène codant pour l'antigène d'intérêt dans le génome de souris. Les lymphocytes B naïfs spléniques de ces animaux sont ensuite isolés, purifiés, et leur spécificité étudiée. Seuls les lymphocytes possédant une forte affinité pour l'antigène cible sont ensuite sélectionnés et mis en culture afin de se différencier en lymphocytes B « *Germinal center-like* ». Ces derniers sont caractérisés par leur phénotype semblable aux lymphocytes issus des centres germinatifs et par le fait qu'ils ont déjà subi une commutation isotypique et, lors de leur différenciation en plasmocytes, sécrètent alors des immunoglobulines de type G et non de type M. Les lymphocytes B « *Germinal center-like* » spécifiques de l'antigène d'intérêt exprimé par la tumeur sont enfin administrés chez les souris. Dans cette étude, ces lymphocytes B transférés se sont ensuite différenciés efficacement *in vivo* en plasmocytes sécrétant des immunoglobulines spécifiques de l'antigène tumoral d'intérêt. Ce mécanisme a ainsi abouti à l'inhibition de la progression tumorale et métastatique et, par conséquent, à la prolongation de la survie des souris. La principale limitation de cette stratégie thérapeutique semble être la complexité de sa mise en œuvre. Cependant, Moutai et al. décrivent, dans cette même publication, un nouveau protocole simplifié permettant d'envisager son application chez l'Homme⁶⁸.

1.1.3.7.2 Fibroblastes

Les fibroblastes, quant à eux, n'appartiennent pas au système immunitaire proprement dit mais possèdent un rôle structural tissulaire grâce à la sécrétion de composés de la matrice extra-cellulaire. Activés en contexte nécessitant un remodelage tissulaire, ces cellules se localisent dans les tissus connectifs. Les fibroblastes associés aux tumeurs constituent un sous-type cellulaire majoritaire du stroma tumoral de nombreux cancers.

Une étude pré-clinique met en avant le rôle protecteur du transfert de fibroblastes dans des modèles murins de carcinome pulmonaire, de fibrosarcome et de cancer du côlon⁶⁹. Ce protocole inclut une activation *ex vivo* des cellules transférées par le facteur de croissance basique des fibroblastes afin d'apparenter leur phénotype à celui des fibroblastes associés aux tumeurs. Cette approche induit une protection des souris contre le développement tumoral induit par inoculation de cellules cancéreuses et un allongement de l'espérance de vie de ces animaux. Cette stratégie est ici utilisée à des fins préventives mais pourrait être intéressante à des fins curatives car entraîne une réponse immune humorale et cellulaire de longue durée, *via* la production d'auto-anticorps dirigés simultanément contre les cellules tumorales et les fibroblastes associés aux tumeurs et grâce au recrutement de lymphocytes T CD4, de lymphocytes T CD8 et de cellules *Natural Killer* NK.

L'exploitation des connaissances et théories actuelles concernant la réponse immune anti-tumorale a ainsi engendré l'élaboration de nombreuses stratégies d'immunothérapie anti-tumorale chez l'Homme. Celles-ci pourraient, en particulier, compléter l'action des approches thérapeutiques de première ligne lorsque ces dernières sont inefficaces ou inadaptées. Malgré le coût de cette procédure, le transfert adoptif cellulaire représente une thérapie de choix chez certains patients et certains types de cancer. Un long chemin reste cependant à parcourir afin de confirmer les protocoles de certaines stratégies, d'améliorer leur rapport efficacité/toxicité et d'explorer l'utilisation de nouvelles cellules. En effet, l'exploitation de certains effecteurs n'est encore qu'au stade pré-clinique et mérite d'être plus amplement investiguée, alors que la découverte et la caractérisation de nouvelles cellules immunitaires

permet d'envisager la création de nouvelles stratégies de thérapie anti-tumorale novatrices chez l'Homme.

1.2 Les cellules lymphoïdes innées (ILC) : une famille de cellules immunes récemment identifiées

1.2.1 Classification et nomenclature

Les cellules lymphoïdes innées, ILC, sont des cellules de morphologie apparentée aux lymphocytes caractérisées par la présence de la chaîne α du récepteur à l'IL-7, CD127, ainsi que par l'absence de récepteur réarrangé spécifique aux antigènes tels que le TCR (*T-cell Receptor*) ou le BCR (*B-cell Receptor*) à leur surface. La particularité de ces cellules est également leur capacité à sécréter rapidement un large panel de cytokines.

Spits et al. ont récemment instauré une nouvelle nomenclature visant à classer ces cellules nouvellement identifiées selon leur production de cytokines et leur dépendance aux facteurs de transcription (Figure 11)⁷⁰. Celle-ci suit de près la classification des lymphocytes T auxiliaires en sous-types 1, 2 et 17. En effet, les ILC sont réparties en 3 groupes.

Les effecteurs du premier groupe produisent tous de l'interféron gamma « IFN γ » (cytokine de type Th1, i.e. sécrétée par les lymphocytes T auxiliaires de type 1) et dépendent des facteurs de transcription T-bet et/ou Eomes. Ce groupe contient les cellules tueuses naturelles NK, CD56⁺ ainsi que les ILC1, CD56⁻. Ces dernières expriment à un niveau variable la perforine et la granzyme, médiateurs de cytotoxicité^{71,72}.

Le second groupe est, quant à lui, essentiellement constitué d'ILC produisant des cytokines de type Th2, telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, l'IL-6 et l'IL-9 et dépendantes des facteurs de transcription (molécules qui, lors de leur expression, régulent la transcription d'autres gènes) GATA-3 et ROR- α pour leur développement. L'activité des ILC2 est stimulée par l'IL-25, l'IL-33 et la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP). Ces cellules sont des effecteurs très importants, notamment lors de réponse immune allergique⁷³.

Enfin, les ILC du troisième groupe produisent toutes de l'IL17 et/ou de l'IL-22, cytokines de type Th17, et dépendent du facteur de transcription ROR γ t pour leur développement. Cette catégorie regroupe les LTi (*Lymphoid-Tissue Inducer cells* : cellules inductrices de tissu lymphoïde), cellules impliquées dans la formation des structures lymphoïdes secondaires⁷⁴, des ILC exprimant NKp46, nommées « NCR⁺ ILC3 » et des ILC n'exprimant pas ce récepteur, nommées « NCR⁻ ILC3 ».

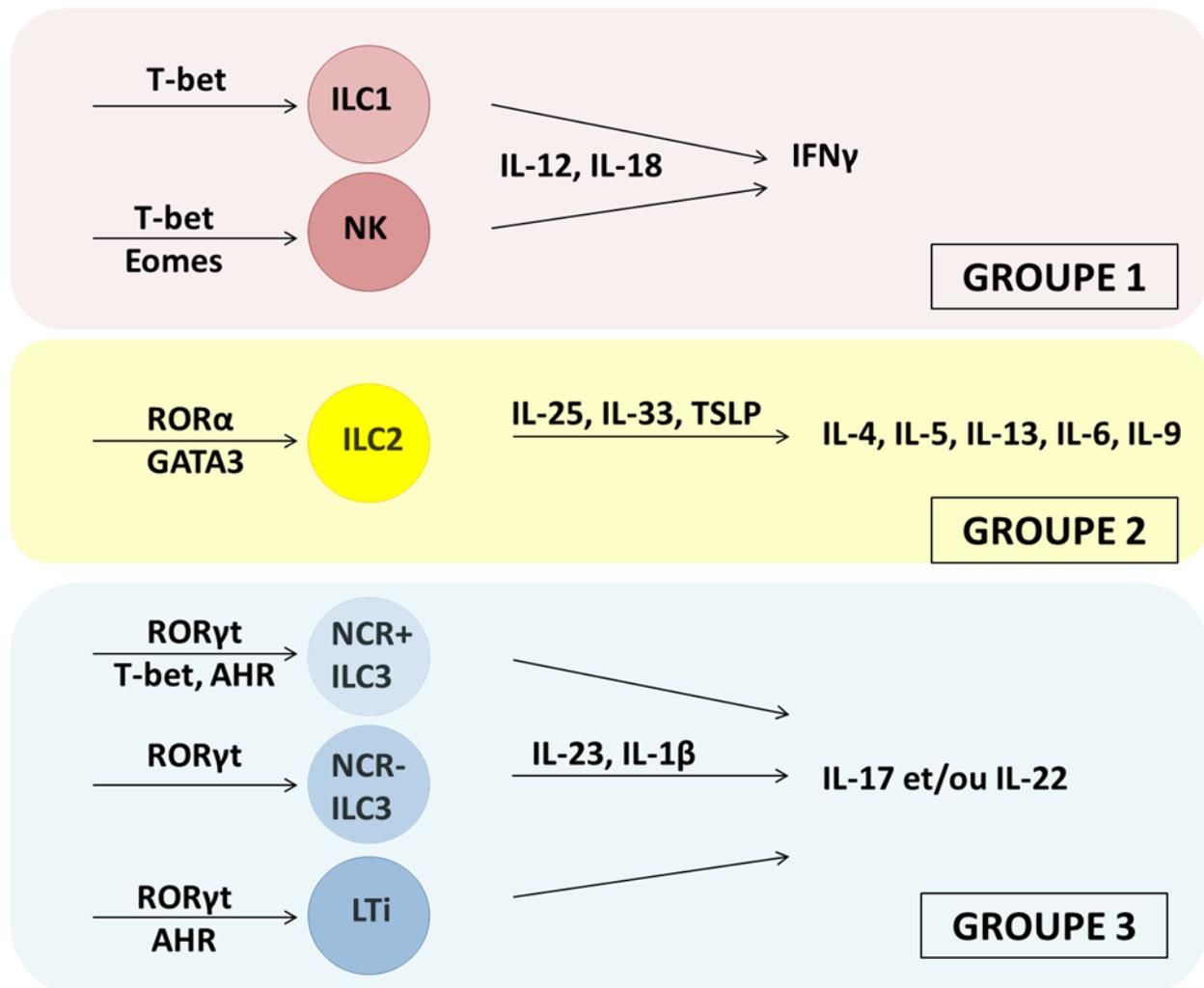


Figure 11. Représentation schématique des sous-types d'ILC.

Les ILC sont réparties selon Spits et al. en trois groupes selon l'expression de facteurs de transcription et la sécrétion de cytokines.

1.2.2 Développement

Constantinides et al. ont récemment démontré que les cellules NK (*Natural Killer*), les LTi (*Lymphoid-Tissue inducer cells*) et le reste des ILC (ILC1, ILC2, ILC3) dérivent de trois progéniteurs différents, dont l'origine est cependant la même, un progéniteur lymphoïde commun (Figure 12)⁷⁵.

Des études sur des modèles murins ont également permis de mettre en évidence que le progéniteur des cellules NK diffère de celui des ILC1, ILC2 et ILC3 par l'expression du facteur de transcription Id2. De plus, la maturation des ILC1, ILC2 et ILC3 à partir de leur progéniteur dépend du facteur de transcription GATA-3, contrairement à celle des cellules NK⁷⁶.

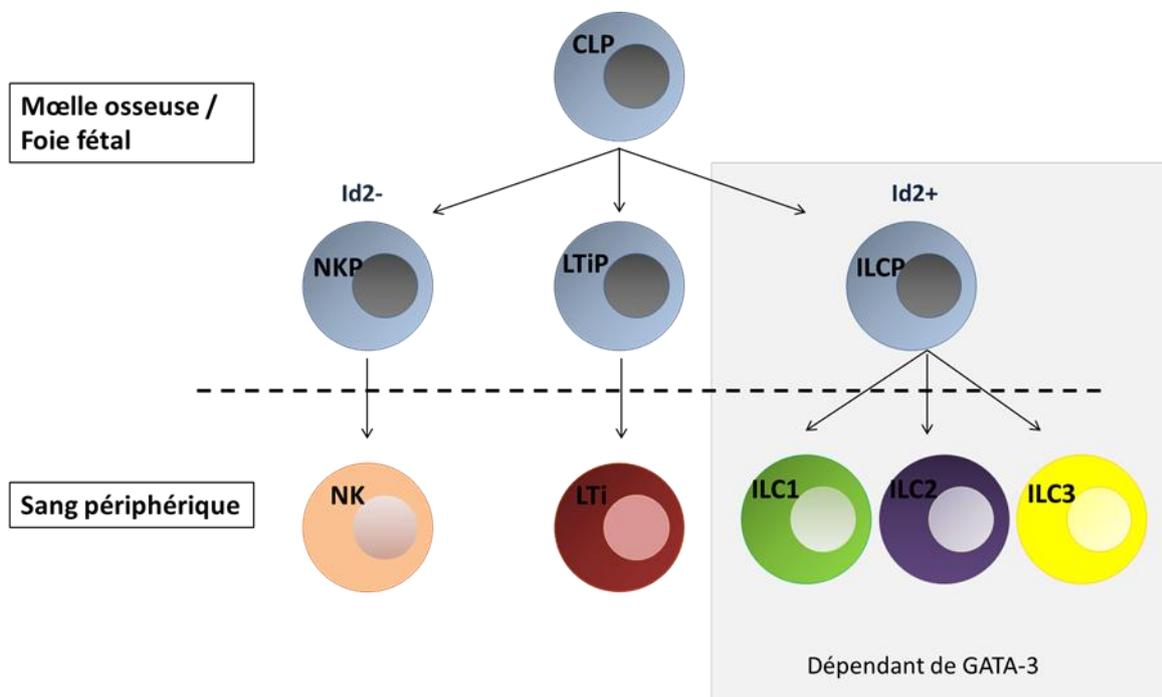


Figure 12. Étapes de développement des ILC. Les ILC1, ILC2 et ILC3 émergent d'un progéniteur commun « ILCP » différant de ceux des cellules tueuses naturelles NK « NKP » et des LTi « LTiP », qui dérivent pourtant tous trois d'un progéniteur lymphoïde commun « CLP ». ILCP diffère de NKP, par son expression du facteur de transcription Id2. La maturation des ILC à partir de ILCP est également dépendante de GATA-3, contrairement à celle des cellules NK.

Cependant, la différenciation des ILC est soumise à une certaine plasticité. En particulier, les ILC3, de phénotype CD56⁻, peuvent donner naissance à des cellules NK cytotoxiques CD56⁺. Cette différenciation est inhibée physiologiquement par le facteur de transcription Ahr⁷⁷. Les ILC3, selon leur expression de récepteur de cytotoxicité naturelle (NCR), peuvent donner naissance à de nouvelles ILC. D'une part, les NCR⁺ ILC3 peuvent perdre l'expression du facteur de transcription RORγt et leur capacité de production d'IL-22 et d'IL-17 au profit de la capacité de sécrétion d'IFNγ⁷⁸. Ces cellules ainsi différenciées se rapprochent alors fonctionnellement et phénotypiquement des ILC1. Les NCR⁺ ILC3 présentes dans la muqueuse déciduale de l'Homme, peuvent aussi se différencier en culture en cellules NK immatures⁷⁹. D'autre part, les NCR⁻ ILC3 peuvent acquérir en culture l'expression de NCR mais ne peuvent se convertir en ILC2⁸⁰.

Enfin, la distribution des ILC est soumise à régulation. Notamment, les ILC3 favorisent, chez les souris, la maturation des cellules NK grâce à la production de lymphotoxine⁸¹. Les métabolites de la vitamine A influent, quant à eux, l'équilibre entre les fréquences des ILC de groupe 3 et de groupe 2⁸².

L'importance quantitative de chacune de ces populations cellulaires ainsi que l'expression de leurs marqueurs dans le sang périphérique ne sont cependant pas encore renseignées de manière détaillée dans la littérature.

1.2.3 Rôles

Les fonctions diverses que possèdent les ILC dépendent de leur sous-type. Celles des cellules NK ayant déjà été détaillées précédemment (cf 1.1.3.4), nous nous focaliserons ici sur l'exploration du rôle des autres sous-types cellulaires afin de mettre en évidence le rôle clé de ces cellules dans la réponse immune anti-tumorale.

1.2.3.1 Induction des ILC lors d'inflammation et de cancer

En premier lieu, la proportion de plusieurs sous-types d'ILC augmente lors de contexte inflammatoire. Alors que celle des LTi (*Lymphoid-Tissue inducer cells*) augmente au sein des amygdales inflammées de façon chronique⁸³, celle des ILC1 augmente dans la muqueuse intestinale de patients atteints de maladie de Crohn⁸⁴. Les ILC2, quant à elles, migrent vers le système cutané, chez la souris, lors de dermatite atopique, indépendamment des lymphocytes T et B⁸⁵ mais également, chez l'Homme, lors de psoriasis⁸⁶.

La modulation de la proportion de ces cellules lors d'inflammation semble importante pour la réponse immune anti-tumorale, étant donné le recrutement de LTi par la tumeur dans un modèle murin de mélanome⁸⁷ et la corrélation entre le recrutement de NCR⁻ ILC3 dans le colon et la progression tumorale dans un modèle murin de cancer colique bactérioinduit⁸⁸.

L'augmentation et la diminution respective des NCR⁺ ILC3 et des ILC2 dans le sang périphérique des patients après traitement de leur leucémie myéloïde aigue soutient également l'hypothèse du rôle des ILC dans l'immunité anti-tumorale. La chimiothérapie d'induction modifie également le phénotype des ILC, en induisant par exemple l'expression de certains récepteurs aux chimiokines et modifiant ainsi probablement leur capacité migratoire⁸⁹.

1.2.3.2 Réponse cytotoxique

Les ILC peuvent également induire une lyse cellulaire en contexte pathologique. En effet, comme détaillé précédemment, les cellules NK sont connues pour leurs propriétés lytiques anti-tumorales *in vivo* chez l'Homme *via* divers mécanismes (cf 1.1.3.4).

Les ILC1 intra-épithéliales des amygdales humaines sécrètent aussi des médiateurs lytiques lors de la reconnaissance de signaux de danger portés par des cellules épithéliales ou des cellules myéloïdes⁹⁰. Ce mécanisme pourrait par conséquent contribuer à la lyse anti-tumorale.

1.2.3.3 Recrutement des cellules immunitaires innées

Les ILC, outre leurs propriétés cytotoxiques directes, recrutent également des effecteurs de l'immunité innée. Alors que, dans un modèle murin de cancer colique bactérioinduit, ce sont les NCR⁺ ILC3 qui attirent les granulocytes dans le côlon grâce à leur production d'IL-22⁸⁸, les ILC2 sont également connues pour leur forte capacité de recrutement cellulaire. Sont concernés, dans des modèles murins, les polynucléaires éosinophiles lors d'infection par les helminthes⁹¹, lors de dermatite atopique⁹², ou lors d'administration de chitine par inhalation, constituant de nombreux allergènes et parasites. En effet, la chitine entraîne la production d'IL-5 et d'IL-13 par les ILC2 qui, ainsi, participent fortement à l'attraction des polynucléaires éosinophiles et des macrophages au niveau pulmonaire⁹³.

Cette fonction exercée par les ILC n'est pas sans influence sur la progression tumorale. En particulier, les ILC2 et les cellules médullaires suppressives (MDSC) s'accumulent au niveau de la tumeur mammaire dans un modèle murin de cancer du sein. Il y est en particulier démontré que le recrutement des MDSC à ce site est médié par l'IL-33, cytokine de référence pour la stimulation des ILC2. Cette interleukine serait produite par la tumeur mammaire et attirerait les ILC2 au niveau de ce site tumoral qui, à leur tour, recruteraient les MDSC. L'accumulation des MDSC dans le micro-environnement tumoral

confère à ce dernier un caractère immunosuppresseur défavorable à l'établissement d'une réponse immune anti-tumorale qui stimulerait la progression de la tumeur⁹⁴. Au contraire, Ikutani et al. ont démontré que les ILC2, dans un modèle murin de mélanome, favorisent la régression de métastases pulmonaires⁹⁵. En effet, ces cellules sécrètent de l'IL-5, recrutant alors des polynucléaires éosinophiles, dont l'infiltration inhibe la progression tumorale.

1.2.3.4 Soutien de la réponse immune adaptative

Les ILC recrutent ainsi des effecteurs de l'immunité innée lors de contexte pathologique tel que le cancer. Il a cependant été récemment démontré que ces cellules possèdent également un rôle important de soutien de la réponse immune adaptative, les plaçant alors à l'interface entre ces deux réponses immunitaires.

1.2.3.5.1. ILC et réponse lymphocytaire T

Les ILC2 de l'Homme, en premier lieu, peuvent exprimer des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) à leur surface et les utiliser afin de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4 *in vitro*. S'ensuit une communication entre ces deux types cellulaires impliquant notamment l'IL-2 et les molécules CD80 et CD86 présentes sur les ILC2 et induisant finalement l'activation des lymphocytes T CD4 naïfs. Ceux-ci se différencient alors, sous l'influence des ILC2, en lymphocytes T auxiliaires 2, prolifèrent, et sécrètent plusieurs cytokines stimulatrices des ILC2, telles que l'IFN γ , l'IL-2 et l'IL-13^{96,97}.

Les ILC peuvent également soutenir le volet mémoire de la réponse lymphocytaire T. Les LTi présents au niveau des structures lymphoïdes secondaires murines interagissent en effet avec les lymphocytes T CD4 mémoires afin de favoriser leur survie. Ce mécanisme est contact-dépendant *via*, entre autres, la liaison entre OX40L présent sur les LTi et OX40, sur-

exprimé à la surface des lymphocytes T CD4 mémoires sous l'influence des cellules stromales de ces structures lymphoïdes⁹⁸.

1.2.3.5.2. ILC et réponse lymphocytaire B

Les ILC ne soutiennent cependant pas seulement la réponse immune médiée par les lymphocytes T mais également celle induite par les lymphocytes B. À ce dessein, les ILC spléniques stimulent la survie des lymphocytes B, leur prolifération, leur capacité sécrétoire en immunoglobulines de type M secrétées précocement lors de réponse immunitaire et leur différenciation en plasmocytes, effecteurs de la sécrétion d'immunoglobulines⁹⁹. La production d'immunoglobulines de type E par les lymphocytes B est également favorisée par les ILC de premier groupe de façon contact-dépendante en contexte allergique chez les souris¹⁰⁰.

1.2.3.5 Réparation tissulaire

Face à leur rôle d'interface entre l'immunité innée et adaptative, les ILC possèdent également une importante fonction de réparation des tissus de l'organisme. Tandis que le virus lymphocytaire de la chorioméningite entraîne une sévère rupture de l'intégrité des structures lymphoïdes, les LTi (*Lymphoid-Tissue inducer cells*) interagissent, chez la souris, avec les cellules stromales afin de les réparer¹⁰¹.

Les LTi ne sont toutefois pas les seules cellules impliquées dans la réparation tissulaire. Kimura et al. ont en effet récemment prouvé que les ILC3 conditionnent le système de réparation épithéliale dans un modèle murin de colite induite par le dextran sulfate de sodium¹⁰².

1.2.3.6 Influence sur la vascularisation tumorale

Enfin, les ILC possèdent des rôles contradictoires vis-à-vis de la progression tumorale, selon leur sous-type, en agissant sur l'intégrité et la mise en place des vaisseaux sanguins irriguant la tumeur. Les ILC2, *via* leur stimulation par l'IL-33, pourraient promouvoir la croissance des tumeurs mammaires en participant à leur processus d'angiogenèse⁹⁴.

A contrario, les LT_i, *via* leur stimulation par l'IL-12, dégradent la micro-vascularisation tumorale dans un modèle murin de mélanome. Cette rupture d'intégrité aboutit alors à la surexpression de molécules d'adhésion par cet épithélium, phénomène associé à l'inhibition de la croissance primaire tumorale ainsi que de la formation de métastases, probablement par stimulation du recrutement de cellules immunitaires au site tumoral¹⁰³.

Les cellules lymphoïdes innées, récemment découvertes et identifiées, semblent être des acteurs clés de la réponse immune anti-tumorale. Même si l'exploration de leurs rôles dans ce contexte n'en est qu'à son début, tous leurs sous-types cellulaires semblent impliqués dans la physiologie du cancer. Les ILC peuvent être spécifiquement recrutées lors d'inflammation et de contexte tumoral et leurs proportions modulées par les chimiothérapies. Ces effecteurs peuvent être cytotoxiques sous l'influence de signaux de danger mais également, de façon très intéressante, interagir avec les cellules immunitaires. Les ILC recrutent effectivement des cellules de l'immunité innée, grâce à la production d'un large panel de cytokines, et stimulent la réponse adaptative lymphocytaire T et B. Enfin, les ILC pourraient posséder des rôles structuraux lors de cancer, *via* leur capacité de réparation tissulaire et leur action sur la vascularisation tumorale.

PARTIE 2 : LES CELLULES LYMPHOÏDES INNÉES

2.1 Introduction

La nécessité de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-tumorales ainsi que le probable rôle des ILC dans le cancer suggéré par les résultats prometteurs rapportés dans des publications récentes ont amené le centre Ludwig à s'intéresser à ces nouveaux effecteurs cellulaires. Cet établissement de recherche suisse sur le cancer est composé de diverses équipes, dont celle de Pr. Romero, dans laquelle j'ai recueilli les données renseignées dans cette deuxième partie. Le laboratoire de Pr. Romero est organisé en deux sous-groupes. Le premier, situé au Biopôle III, à Épalinges, s'intéresse à la régulation des réponses lymphocytaires T spécifiques anti-tumorales grâce à des expérimentations murines. Le deuxième, au sein duquel j'ai recueilli ces données, est localisé sur le campus du Centre Hospitalo-Universitaire Vaudois (CHUV), à Lausanne, et est dédié à l'étude des réponses immunes anti-tumorales chez l'Homme.

Les données présentées dans cette deuxième partie sont donc le résultat des expériences que j'ai réalisées dans cet institut durant un stage de cinq mois, dans le cadre du Master 2 de Recherche en Immunologie (spécialisation Physiologie de la Réponse Immune) de l'Université Paris Descartes. Cette étude s'intègre dans un programme de recherche translationnelle plus vaste portant sur l'immunothérapie anti-tumorale, et a été réalisée en collaboration avec le Centre Hospitalo-Universitaire Vaudois (CHUV) et l'Université de Lausanne (Unil), grâce aux fonds alloués par les fondations San Salvatore, Novartis et ProFemmes UNIL.

Le phénotype et la distribution des ILC chez l'Homme sont encore peu détaillés dans la littérature mais nécessaires à connaître afin de mieux comprendre le rôle de ces cellules dans le cancer. La détermination de ces données a ainsi constitué le principal objectif de ce projet. Cette deuxième partie s'oriente donc autour de trois axes :

- (1) la comparaison, chez l'Homme, de la proportion des ILC dans le sang périphérique en contexte sain ou cancéreux ;
- (2) la caractérisation étendue et minutieuse par cytométrie en flux de l'expression, sur les ILC de sang périphérique de donneurs sains, de marqueurs de surface impliqués dans la réponse immunitaire anti-tumorale ;
- (3) l'analyse de la présence de récepteurs de la famille Toll (TLR) au niveau ARN messenger par biologie moléculaire, afin de déterminer si les ILC peuvent être ciblées par les adjuvants utilisés lors d'immunothérapies anti-tumorales.

Ces travaux ont amené la présentation d'un poster au congrès EMBO « ILC1 » de l'institut Pasteur du 29 septembre 2014 au 1^{er} octobre 2014 (cf. Annexe 1).

Les données ici présentées ont également été partiellement intégrées dans un article dont je suis co-auteur soumis à la revue scientifique Blood : « CD127+ innate lymphoid cells (ILC) are dysregulated in treatment naïve acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis ».

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Donneurs humains

Des buffy coat (fraction leucocytaire du sang ainsi déplété en plasma et érythrocytes) de 37 donneurs sains (20 femmes, 17 hommes) âgés de 20 à 72 ans ont été fourni par le Service Vaudois de Transfusion. Des échantillons de sang périphérique de patients atteints d'adénocarcinome du colon (n=5, âge [58-83], moyenne 74 ans), de cancer tête et cou (n=8, âge [53-70], moyenne 59 ans) ou de mélanome métastatique (n=7, âge [36-84], moyenne 64 ans) ont par ailleurs été obtenus auprès de Pr. Daniel Speiser et Dr. Jean-Paul Rivals. Tous les patients et donneurs sains ont délivré un consentement écrit et éclairé. La collecte de sang périphérique en contexte cancéreux est le fruit d'études cliniques (numéros de référence : mélanome : n°87/06, cancer tête et cou : n°72/02).

2.2.2 Préparation des échantillons

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont isolées de leur milieu par centrifugation en gradient de densité grâce au Ficoll (Lymphoprep, Fresenius) puis congelées dans l'azote liquide. Après décongélation, les cellules sont resuspendues dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) supplémenté à 10% en sérum de veau fœtal et lavées avec une solution tamponnée phosphatée (PBS).

2.2.3 Cytométrie en flux

Les cellules sont ensuite resuspendues dans une solution FACS (PBS 50 μ M EDTA, 0.2% BSA) et incubées durant 20 minutes à +4°C avec un cocktail de lignage cellulaire (cf ci-dessous) et des anticorps dirigés contre les marqueurs CRTh2, CD56, CD127, NKp46, c-KIT et les marqueurs d'intérêt (Tableau 1).

Cible	Fluorescence	Compagnie	Clone	Hôte, Isotype	Ligand de la cible
CD3	FITC	Beckman Coulter	UCHT1	souris IgG1	<i>Marqueurs de lignage cellulaire</i>
CD4		Beckman Coulter	13B8.2	souris IgG1	
CD8		AbD Serotec		souris IgG1	
CD14		Beckman Coulter	RMO52	souris IgG2a	
CD15		Beckman Coulter	80H5	souris IgM	
CD16		Beckman Coulter	3G8	souris IgG1	
CD19		Beckman Coulter	J3-119	souris IgG1	
CD20		BioLegend	2H7	souris IgG2b	
CD33		BioLegend	HIM3-4	souris IgG1	
CD34		BioLegend	561	souris IgG2a	
Fcε RIα		BioLegend	AER-37	souris IgG2b	
CD203c		BioLegend	NP4D6	souris IgG1	
CRTh2 [CD294]		PE-CF594	BD Biosciences	BM16	
CD56	Alexa 700	BioLegend	HCD56	souris IgG1	
CD127	Brilliant Violet	BioLegend	A019D5	souris IgG1	
NKp46 [CD335]	PE-Cy7	BD Biosciences	9E2/NKp46	souris IgG1	
NKp46 [CD335]	PerCP Cy5.5	BioLegend	9E2/NKp46	souris IgG1	
c-KIT [CD117]	APC	BD Biosciences	YB5.B8	souris IgG1	
CCR1	Alexa 647	BioLegend	TG4/CCR1	souris IgG2b	CCL-3, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -13, -14, -15, -16, -23
CCR2	PerCP Cy5.5	BioLegend			CCL-2, -12, -13, -27
CCR4	PECy7	BD Biosciences	1G1	souris IgG1	CCL-17, -22
CCR5	PerCP Cy5.5	BioLegend	HEK/1/85a	rat IgG2a	CCL-3, -5, -8, -4, 2
CCR6	PE	BD Biosciences	11A9	souris IgG1	CCL-20
CCR7	PerCP Cy5.5	BioLegend	G043H7	souris IgG2a	CCL-19, -21
CCR10	APC	BioLegend	6588-5	Hamster Arménien, IgG	CCL-27, -28
CX3CR1	PECy7	BioLegend	2A9-1	rat IgG2b	CX3CL1
CXCR3	PECy7	BD Biosciences	1C6/CXCR3	souris IgG1	CXCL-4, -9, -10, -11, -13
CXCR4	PECy7	eBioscience	12G5	souris IgG2a	CXCL12
CD1c	APC-eF780	BioLegend	L161	souris IgG1	TCR restreint au CD1c
CD27	APC-eF780	eBioscience	O323	souris IgG1	CD70
CD39	PE	Abcam		souris IgG1	ATP, ADP
CD44	PE	Pharmingen	G44-26	souris IgG2b	acide hyaluronique
CD58	APC	eBioscience	TS2/9	souris IgG1	CD2
CD62L	APC-eF780	eBioscience	DREG-56	souris IgG1	CD34, GlyCAM, MAdCAM-1
CD70	PE	BD Biosciences	Ki-24	souris IgG3	CD27
CD73	PECy7	BioLegend	AD2	souris IgG1	AMP
CD80	PECy7	BD Biosciences	L307.4	souris IgG1	CTLA-4, CD28
CD86	APC	BioLegend	IT2.2	souris IgG2b	CTLA-4, CD28
CD94 [KLRD1]	PE	Immunotech	HP-3B1	souris IgG2a	Complexes HLA:Peptide
CD95 [Fas]	PECy7	BioLegend	DX2	souris IgG1	CD178 [FasL]
CD96 [TACTILE]	PE	BioLegend	NK92.39	souris IgG1	CD155
CD154 [CD40L]	APC-eF780	BioLegend	24-31	souris IgG1	CD40
CD161	PECy7	BioLegend			LLT1
CD178 [FasL]	PE	BioLegend	NOK-1	souris IgG1	CD95 [Fas]
CD253 [TRAIL]	PE	BioLegend	RIK-2	souris IgG1	DR4, DR5
TIM-3	PE	R&D		rat IgG2A	Galectin-9
Siglec-7 [p75, AIRM1]	PE	Beckman Coulter	Z176	souris IgG2b	acides sialiques
HLA-DR	APC-eF780	eBioscience	LN3	souris IgG2b	CD3/TCR, CD4

Tableau 1. Anticorps utilisés en cytométrie de flux.

Puis, les cellules sont lavées et incubées avec le réactif VIVID (« aqua fluorescent reactive dye », Life Technologies) durant 20 minutes à +4°C. Enfin, après un nouveau lavage dans du PBS, les cellules sont resuspendues dans 200 µL de solution FACS. L'analyse de la fluorescence des cellules est ainsi analysée par un protocole de cytométrie en flux à dix couleurs grâce au cytomètre Gallios cell analyser (Beckman Coulter). Les résultats obtenus sont alors interprétés grâce au logiciel Flowjo (version X.0.7). L'intensité de fluorescence des ILC est comparée, pour chaque marqueur, avec celle obtenue lors d'incubation des cellules avec un anticorps de contrôle du même isotype que celui de l'anticorps dirigé contre le marqueur d'intérêt. La zone de fluorescence des cellules positives, c'est-à-dire de celles ayant fixé l'anticorps contre le marqueur d'intérêt, est déterminée comme débutant à l'endroit où finit celle des cellules incubées avec l'anticorps isotypique de contrôle (Figure 13). Le seuil de positivité de fluorescence des ILC est ainsi arrêté pour chaque anticorps d'intérêt (Figure 14).

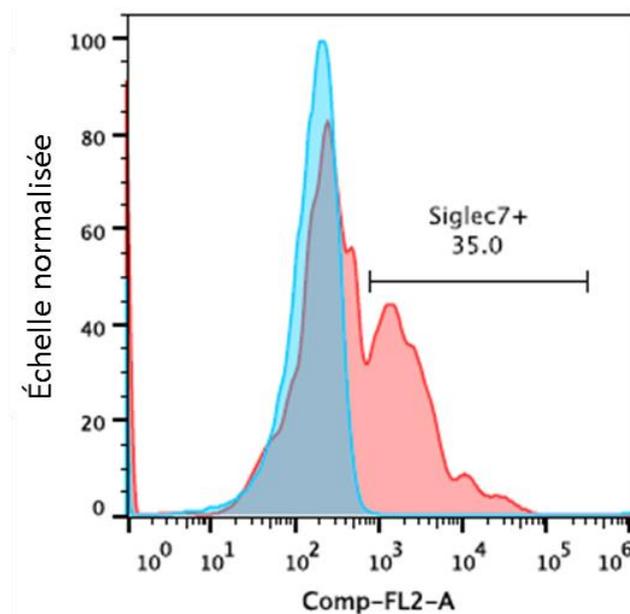
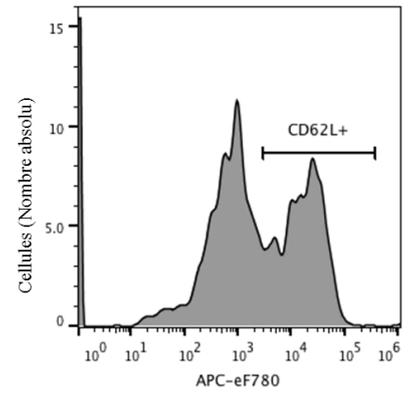
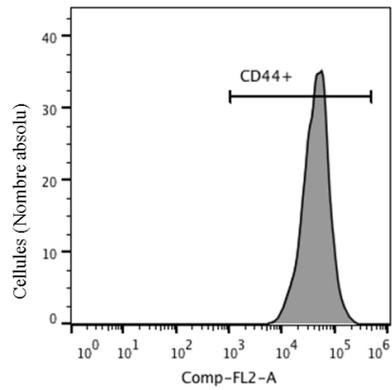
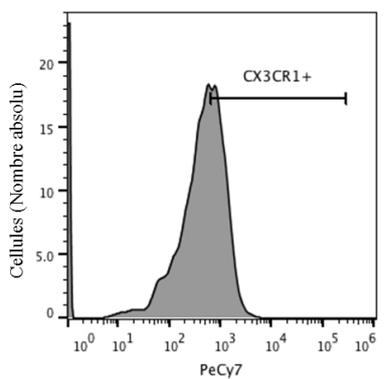
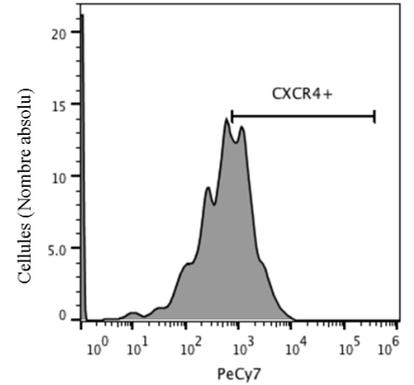
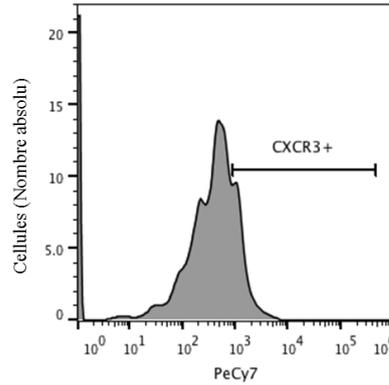
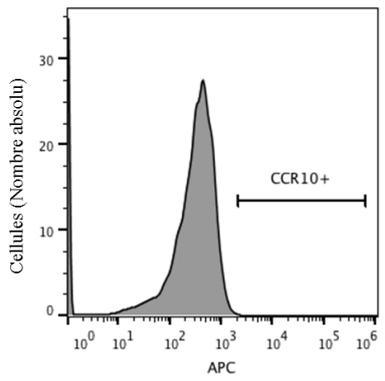
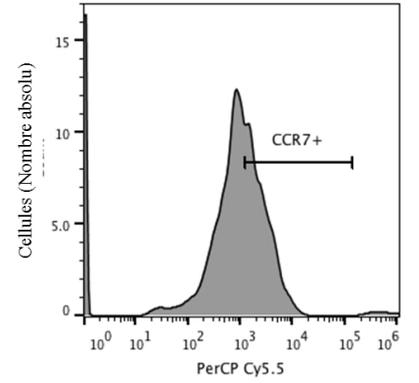
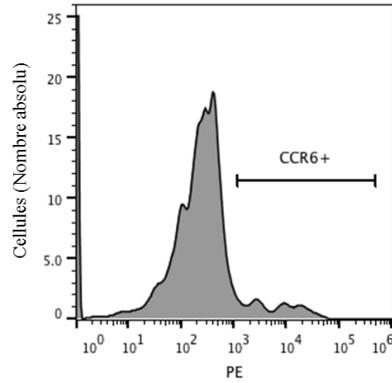
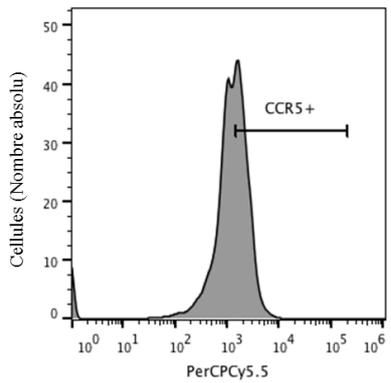
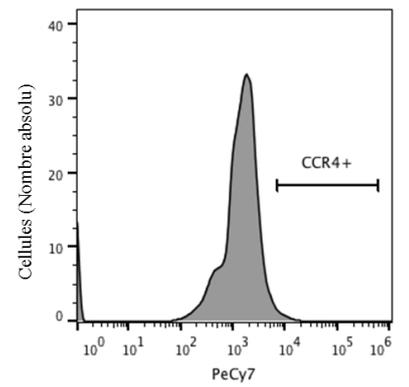
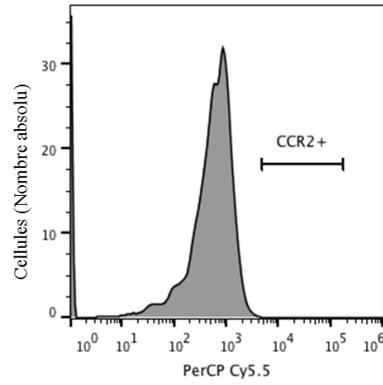
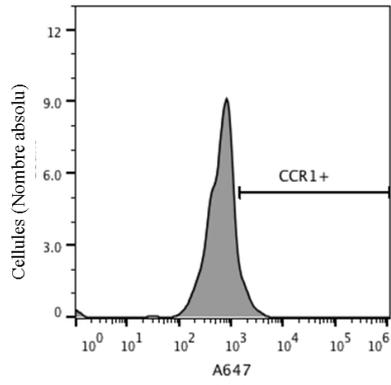
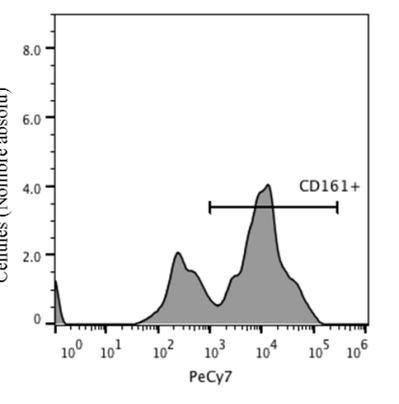
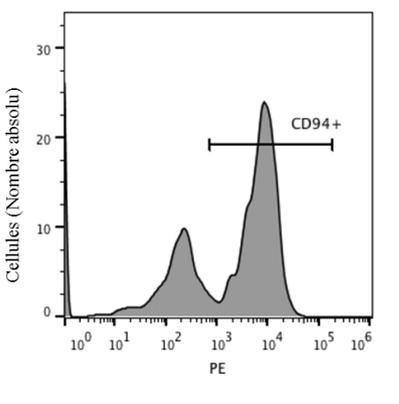
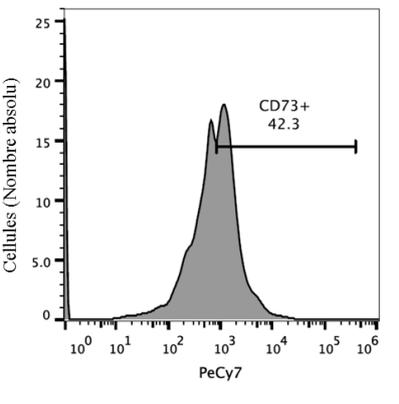
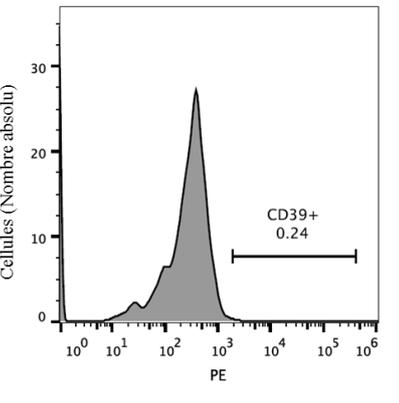
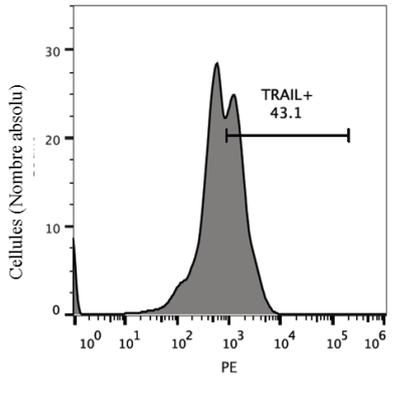
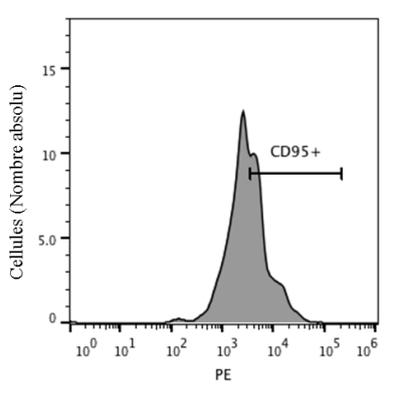
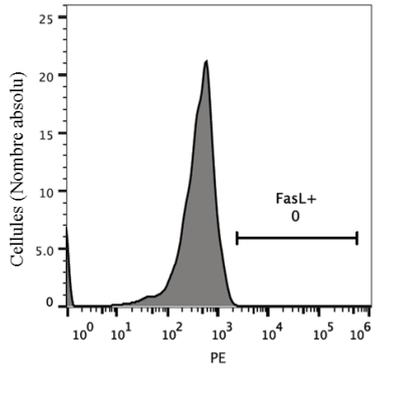
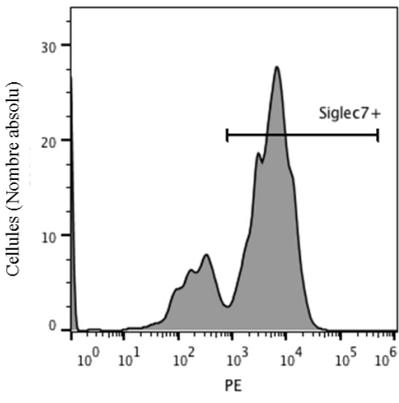
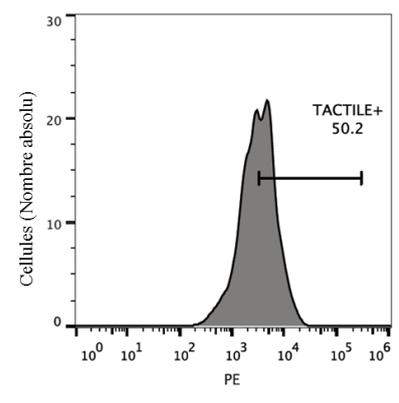
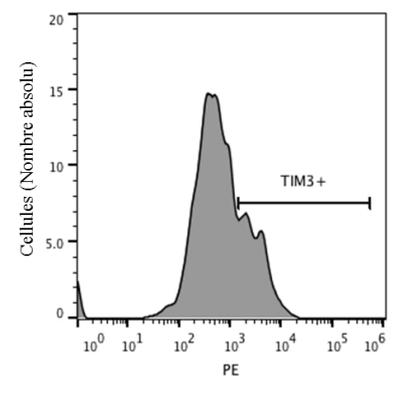
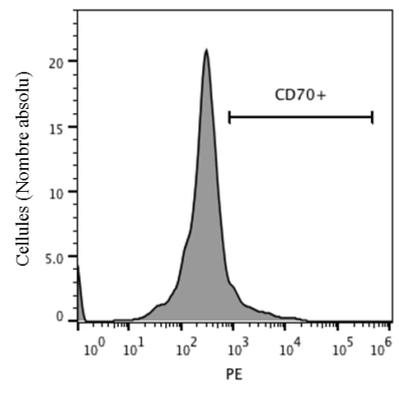
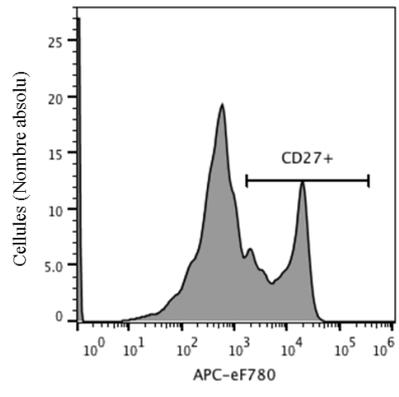


Figure 13. Détermination du seuil de positivité de fluorescence des ILC pour un marqueur d'intérêt.

L'arrêt de la valeur de fluorescence à partir de laquelle les cellules sont considérées comme exprimant le marqueur d'intérêt, ici Siglec-7, est réalisé par comparaison de la fluorescence des ILC incubées avec un contrôle isotypique (en bleu) avec celle des ILC incubées avec l'anticorps dirigé contre le marqueur d'intérêt (en rouge). La barre horizontale correspond à la délimitation de la zone constituée des cellules positives pour le marqueur d'intérêt. Ici, 35% des ILC sont ainsi Siglec-7+.





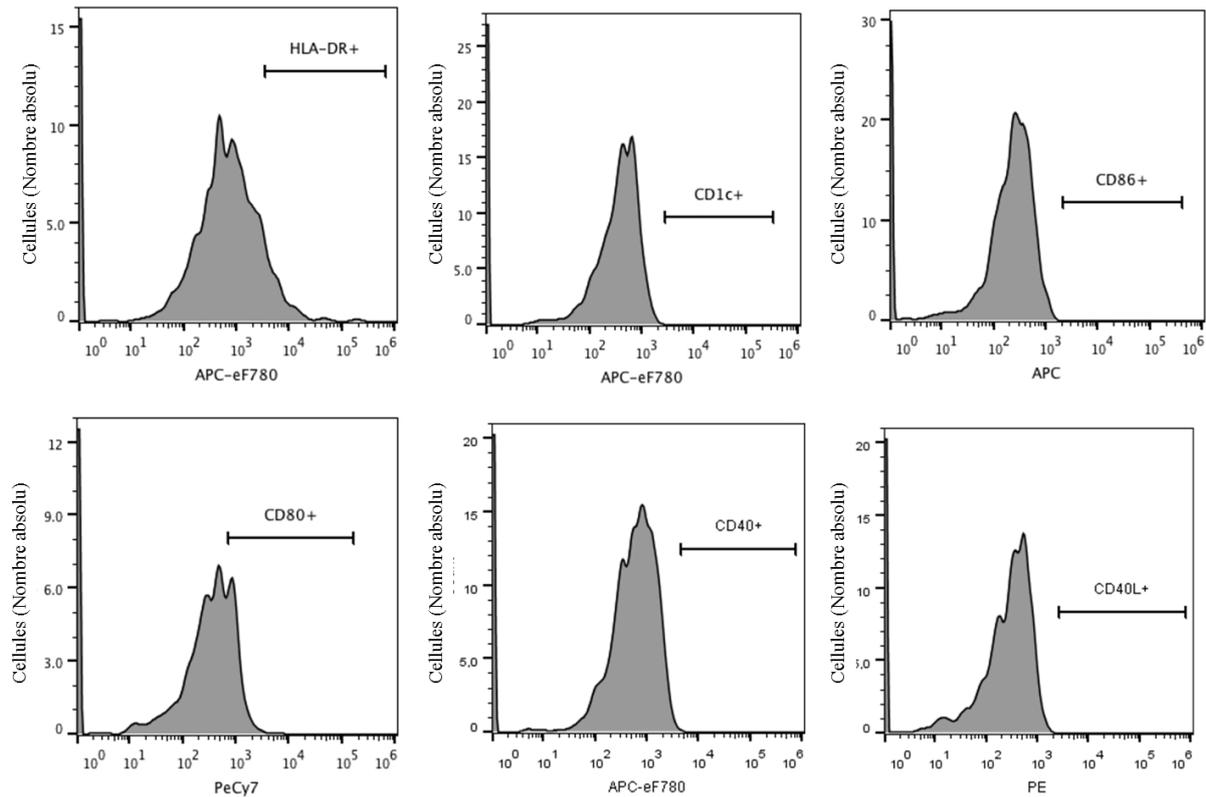


Figure 14. Détermination des seuils de positivité de fluorescence des ILC pour chaque marqueur d'intérêt.

L'intensité de fluorescence des cellules après incubation avec un anticorps dirigé contre le marqueur d'intérêt est obtenue par cytométrie de flux (en gris). La barre horizontale délimite la zone de fluorescence dans laquelle les cellules sont considérées positives pour le marqueur d'intérêt.

2.2.4 Stratégie de caractérisation des ILC

La proportion des ILC dans le sang périphérique est établie par les données recueillies lors de la cytométrie en flux (Figure 15). Les lymphocytes sont d'abord sélectionnés selon leur taille (FSA) et leur granulométrie (SSA). Puis, les agrégats de cellules sont éliminés de par l'hétérogénéité de leur phénotype, ainsi que les cellules mortes grâce au marquage de viabilité cellulaire VIVID. Les ILC sont ensuite sélectionnées comme exprimant CD127 mais pas les marqueurs de lignage cellulaire. La proportion des divers sous-types d'ILC est enfin déterminée par sélection de ceux-ci grâce à leur expression de NKp46, CRTh2, c-Kit et CD56 (Tableau 2). Les ILC1 sont ainsi [CRTH2⁻ NKp46⁻ CD56⁻ cKit⁻], les cellules CD56⁺ NCR⁺ [CRTH2⁻ NKp46⁺ CD56⁺ cKit⁻], les ILC2 [CRTH2⁺ NKp46⁻ cKit^{+/-}], les NCR⁺ ILC3

[CRTH2⁻ NKp46⁺ CD56^{+/-} cKit⁺], les LTI [CRTH2⁻ NKp46⁻ CD56⁻ cKit⁺] et les cellules CD56⁺ NCR⁻ [CRTH2⁻ NKp46⁻ CD56⁺ cKit^{+/-}].

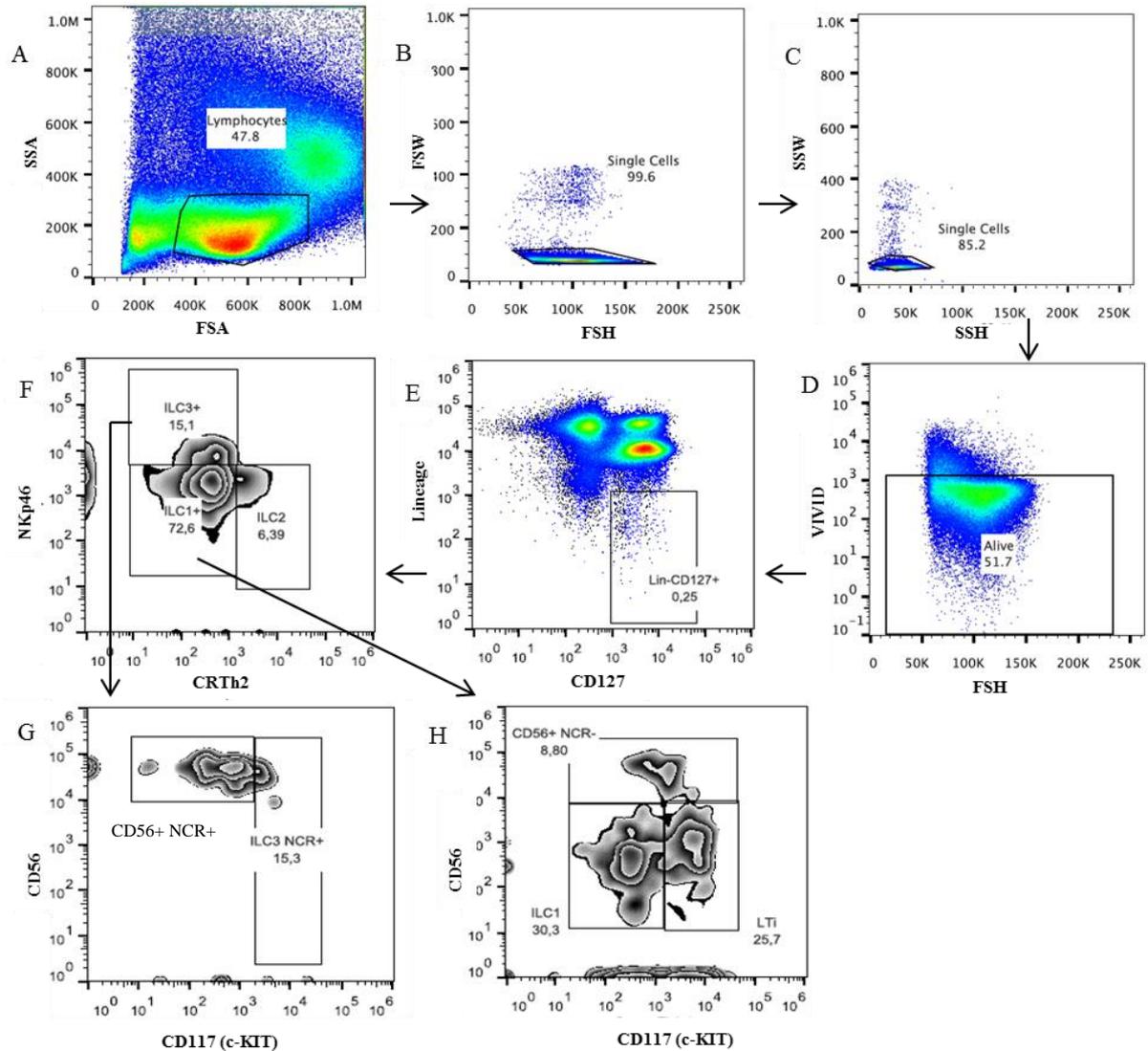


Figure 15. Stratégie de caractérisation des ILC par cytométrie de flux.

Les lymphocytes sont sélectionnés selon leur taille et leur granulométrie (A). Les agrégats de cellules et les cellules mortes sont ensuite éliminés selon, respectivement, leur forte hétérogénéité de morphologie représentée par SSW et FSW (B, C) et leur incorporation du marqueur de viabilité cellulaire VIVID (D). Les ILC sont ensuite sélectionnées comme exprimant CD127 mais pas les marqueurs de lignage cellulaire et la détermination de leur expression en NKp46 et CRTh2 permet la différenciation de 3 groupes: « ILC3+ » (NKp46⁺ CRTh2⁻), « ILC1+ » (NKp46⁻ CRTh2⁻) et les ILC2 (NKp46⁺ CRTh2⁺). Les autres sous-types des ILC sont ensuite sélectionnés au sein des groupes « ILC3+ » et « ILC1+ » grâce à la présence ou non de CD56 et c-Kit à leur surface: ILC1 [CRTH2⁻ NKp46⁻ CD56⁻ cKit⁺], ILC CD56⁺ NCR⁺ [CRTH2⁻ NKp46⁺ CD56⁺ cKit⁺], NCR⁺ ILC3 [CRTH2⁻ NKp46⁺ CD56^{+/-} cKit⁺], LTI [CRTH2⁻ NKp46⁻ CD56⁻ cKit⁺] et ILC CD56⁺ NCR⁻ [CRTH2⁻ NKp46⁻ CD56⁺ cKit^{+/-}].

Marqueurs	ILC1	CD56+ NCR+	ILC2	NCR+ ILC3	LTi	CD56+ NCR-
NKp46	-	+	-	+	-	-
CRTh2	-	-	+	-	-	-
c-KIT	-	-	+/-	+	+	+/-
CD56	-	+	+/-	+/-	-	+

Tableau 2. Caractérisation des ILC en cytométrie de flux.

Les divers sous-types d'ILC sont identifiés à partir des ILC totales chez l'Homme grâce à leur expression de NKp46, CRTh2, c-KIT et CD56.

2.2.5 Extraction de l'ARN et transcription en ADNc

Les divers sous-types d'ILC ainsi que les monocytes et lymphocytes T utilisés pour les contrôles positifs et négatifs sont triés sur le trieur cellulaire MoFlo Astrios (Beckman Coulter). L'ARN des ILC est ensuite extrait et transcrit en ADN complémentaire (ADNc) selon la méthode établie par Rufer et al.¹⁰⁴.

2.2.6 Amplification par PCR de l'ADNc et électrophorèse

Un mélange PCR (*Polymerase Chain Reaction* : Réaction de polymérase en chaîne) est préparé, contenant, pour chaque type d'ADN complémentaire (ADNc) à amplifier, 4 µL de solution PCR, 0,4 µL de désoxyribonucléotides (Sigma), 0,1 µL de polymérase Taq (KAPA Taq HotStart DNA Polymerase, 5U/µL) et 13,70 µL d'eau exempte d'enzyme dégradant l'ARN (RNase). Ce mélange est ensuite supplémenté en amorces sens et anti-sens (0,4 µL de chaque, toutes deux à 0,1 µg/µL) et transféré dans des tubes à PCR. Y est ensuite ajouté 1 µL d'ADNc d'ILC, de monocytes ou de lymphocytes T CD8 ou 1 µL d'eau exempte de RNase. Le programme de PCR utilisé est réalisé par T3000 Thermocycler (Biometra) et consiste en 2 minutes de chauffage à 94°C suivies de 40 cycles de programme d'amplification de l'ADNc à trois étapes (30 secondes à 94°C, 45 secondes à 58°C et 60 secondes à 72°C) et, finalement, en un chauffage des échantillons à 72°C durant 10 minutes. Chaque échantillon amplifié obtenu est ensuite, après y avoir ajouté un marqueur de chargement, déposé dans un puits d'agarose à 5%. L'électrophorèse est alors mise en réalisation durant 20 à 30 minutes à 120V.

L'analyse électrophorétique est qualitative et réalisée par comparaison entre les bandes obtenues pour l'échantillon d'intérêt et celles du contrôle positif. Un échantillon est ainsi déclaré :

- positif lors de la présence d'une bande électrophorétique correspondant au poids moléculaire attendu, i.e à la même distance de migration que celle du contrôle positif, et d'intensité supérieure ou égale à la bande obtenue pour l'échantillon contrôle positif ;
- « +/- » lors de la présence d'une bande électrophorétique correspondant au poids moléculaire attendu mais d'intensité inférieure à la bande obtenue pour l'échantillon contrôle positif ;
- négatif lors de l'absence de bande électrophorétique correspondant au poids moléculaire attendu.

Amorces	Séquence sens	Séquence anti-sens
TLR1	5' GGGTTGAAGCACTGGACAAT 3'	5' CAGAGAAGCCTGATTGGAGG 3'
TLR2	5' AAAAAGCCATTCCCCAGCG 3'	5' TTACCCAAAATCCTTCCCGC 3'
TLR3	5' TTAGCACGGCTCTGGAAACAA 3'	5' TCTCGTCAAAGCCGTTGGA 3'
TLR4	5' GACTTGGCCCTAAACCACACAG 3'	5' GAACCACCTCCGTGATAAAACG 3'
TLR5	5' AGAGATGGCTGGTGCCTTCAA 3'	5' CATCAACTGGTACTGGGACAAGGA 3'
TLR6	5' GAGTGTTTGCTGGAGTCCGA 3'	5' GCCAACCTTTCACCTCCTGA 3'
TLR7	5' TCAAGCCTTAGATTGGCGATGTC 3'	5' CCAGAGATTGATTTGGGAATTTGTG 3'
TLR8	5' AGGCTCAAGCACATCCCAA 3'	5' TCGAGACGAGGAAACTGCTG 3'
TLR9	5' GAGCTGCGAGAGCTCAACCTT A 3'	5' GCGCTTACATCTAGTATTTGCAGG 3'
TLR10	5' ATGCTAGTTCTGGGGTTGGC 3'	5' CCCTGTGCCATGTTTGTGTG 3'

Tableau 3. Séquences nucléotidiques des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification de l'ADNc par PCR.

Toutes les amorces ainsi que le marqueur de poids de l'ADN (100 paires de base) proviennent de chez Metabion (Tableau 3). La solution PCR contient 75 mM de KCl (AppliChem), 15 mM de Tris-HCl (pH 8,8; AppliChem), 0,15 mg/mL d'albumine de sérum bovin (Roche) et 3 mM de MgCl₂.

2.2.6 Méthodes statistiques

Le logiciel Prism (GraphPad Software, version 6.04) est utilisé pour tous les tests statistiques. Le test t non apparié à correction de Welch est appliqué tout le long de cette étude.

2.3 Résultats - Discussion

2.3.1 Dérégulation de la proportion des ILC lors de cancer

Des études récentes ont démontré l'enrichissement ou la déplétion en divers sous-types d'ILC en contexte inflammatoire ou tumoral (cf 1.2.3.1). Cependant, la distribution des ILC chez l'Homme est encore peu détaillée dans la littérature. Notamment, la comparaison des proportions des ILC entre des donneurs sains et des patients atteints de cancer reste encore à réaliser, afin d'évaluer la possible influence d'un contexte tumoral sur l'homéostasie de ces cellules. Nous avons donc déterminé par cytométrie en flux la proportion des ILC totales ainsi que la fréquence relative de leurs divers sous-types dans le sang périphérique de donneurs sains et de patients atteints de mélanome, de cancer cellulaire squameux tête et cou ou d'adénocarcinome du colon.

Nous avons tout d'abord analysé la proportion totale des ILC ainsi que la distribution de leurs divers sous-types dans le sang périphérique de 32 donneurs sains (4 femmes et 4 hommes par catégorie d'âge ; catégories d'âge : 0-29, 30-44, 45-59, plus de 60 ans). Les résultats obtenus ont ainsi démontré que les ILC sont bien présentes dans ce contexte, à raison de 0,344% des lymphocytes périphériques sanguins (n=32, écart-type 0.267) (Figure 16). Les fréquences relatives des divers sous-types ont ensuite été calculées dans ce même tissu. Le sous-type cellulaire CD56⁺ NCR⁺ y est majoritaire et représente 31,2% des ILC totales (écart-type 18,87). Il est suivi par les cellules CD56⁺ NCR⁺ (20,1%, écart-type 10,5) et les ILC1 (19,7%, écart-type 10,3). Les LTI constituent, quant à eux, 14,6% des ILC totales et sont plus présents que les ILC2 (11,3%, écart-type 7,8). Enfin, les NCR⁺ ILC3 sont très faiblement représentées dans le sang périphérique car ne constituent que 2,61% des ILC totales (écart-type 1,27).

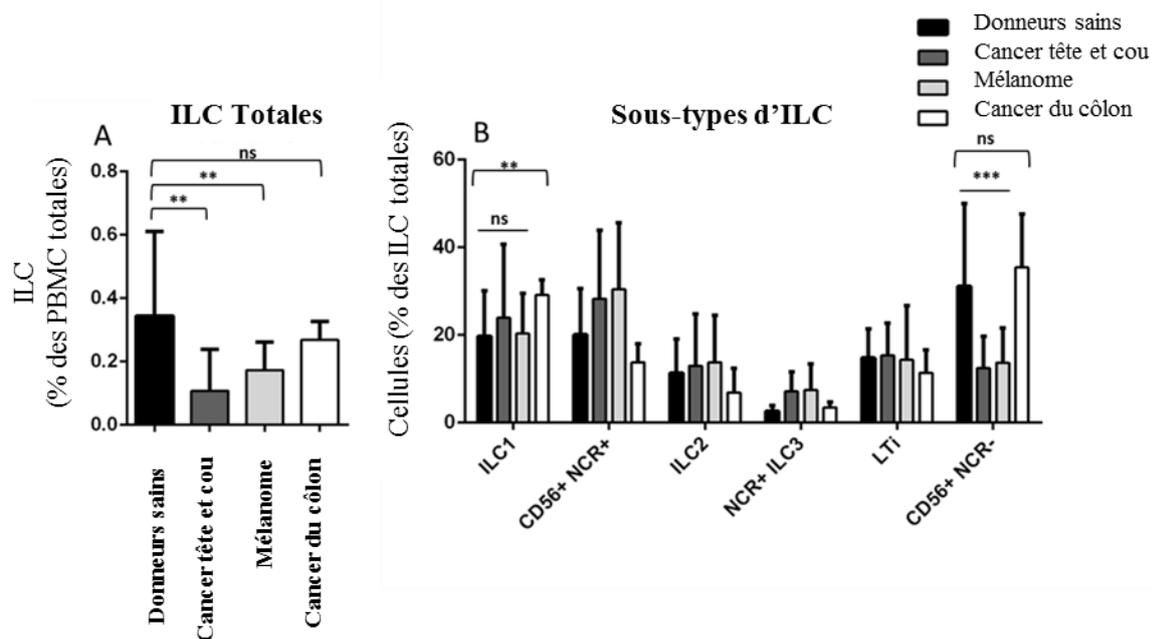


Figure 16. Comparaison de la proportion des ILC dans le sang périphérique de donneurs sains et de patients atteints de cancer.

Les ILC ont été identifiées par cytométrie de flux chez des donneurs sains et des patients atteints d'adénocarcinome du côlon, de cancer tête et cou ou de mélanome selon la stratégie précédemment détaillée. Comparaison de la proportion des ILC totales du sang périphérique (A) et des proportions relatives des divers sous-types (B) entre des donneurs sains (n=32, ratio femmes:hommes 1:1, de 20 à 72 ans, moyenne 44 ans) et des patients atteints de mélanome (n=7), de cancer du côlon (n=5) ou de cancer cellulaire squameux tête et cou (n=8). Comparaison de la proportion des ILC totales: Cancer tête et cou – donneurs sains (“HD”): p=0.0016, mélanome – HD: p=0.0061, cancer du côlon – HD: p=0.1719; Comparaison des fréquences relatives en ILC1: Cancer tête et cou – HD: p=0.5219, mélanome – HD: p=0.8814, cancer du côlon – HD: p=0.0011; Comparaison des fréquences relatives des ILC CD56⁺ NCR⁻: Cancer tête et cou – HD: p=0.0001, mélanome – HD: p=0.0007, cancer du côlon - HD : p=0.5260. Le test t non apparié à correction de Welch a été utilisé pour l'établissement de ces comparaisons.

Nous avons ensuite recueilli ces données chez des patients atteints d'adénocarcinome du côlon (n=5), de mélanome (n=7) ou de cancer tête et cou (n=8) et comparé celles-ci avec les données obtenues chez les donneurs sains. En effet, la proportion totale des ILC dans le sang périphérique diminue lors de mélanome (p=0,0061, Test t non apparié avec correction de Welch) et de cancer tête et cou (p=0,0016, idem), alors qu'elle ne diffère pas entre les patients atteints de cancer du côlon et les donneurs sains (p=0,1719, idem). De plus, la distribution relative des sous-types d'ILC varient en contexte tumoral. Notamment, les ILC sont enrichies en ILC1 lors de cancer, même si cette différence n'a été démontrée significative statistiquement que chez les patients atteints de cancer du côlon (p=0,0011 VS p=0,8814 lors de mélanome et p=0,5219 lors de cancer tête et cou, test t non apparié à correction de Welch).

Au contraire, les ILC sont appauvries en cellules CD56⁺ NCR⁻ lors de mélanome (p=0,0007, idem) et de cancer tête et cou (p=0,0001, idem).

Ces résultats démontrent ainsi que la proportion des ILC est soumise à des variations lors de cancer. Ceci pourrait en particulier être dû à une expansion sélective d'autres effecteurs cellulaires, diminuant ainsi la représentation des ILC parmi les lymphocytes périphériques sanguins. Mais une autre explication consisterait en la migration des ILC dans les autres organes et les tumeurs.

2.3.2 Migration des ILC vers les tissus sains et cancéreux

Des travaux récents attestent de la présence des ILC dans divers tissus sains humains ainsi que de leur migration sélective vers certains organes en contexte pathologique (cf. 1.2.3.1). La migration des cellules au sein de l'organisme est médiée par des gradients de chimiokines. Les cellules sont ainsi attirées vers des organes à forte concentration en chimiokines interagissant aux récepteurs présents à leur surface. Ce phénomène est utile en contexte physiologique pour le développement des lymphocytes T et B, par exemple, mais également en contexte pathologique afin de recruter les cellules au site lésionnel¹⁰⁵. Les cellules tumorales ainsi que leur micro-environnement sécrètent un panel de chimiokines permettant le recrutement d'effecteurs immunitaires et dépendant de la localisation de la tumeur. Les chimiokines CCL2, CCL3, CX3CL1 et CCL5 peuvent ainsi être augmentées au niveau des tumeurs du sein^{106,107}, tout comme les chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL3 au site du mélanome¹⁰⁸. Les chimiokines CXCL20 et CXCL14 sont, quant à elles, respectivement surexprimées génétiquement dans des lignées de cancer colorectal et de cancer de la prostate^{109,110}, alors que les cellules du cancer du poumon non à petites cellules sécrètent la chimiokine CXCL8¹¹¹. La chimiokine CXCL12 est également présent dans de nombreux micro-environnements tumoraux, notamment lors de cancer colorectal, gastrique, rénal, pulmonaire, du sein, nasopharyngé, ovarien, pancréatique, prostatique ou de la thyroïde¹¹². Cette liste non exhaustive met ainsi en évidence l'existence d'une signature chimiokinique de la tumeur permettant l'attraction d'effecteurs cellulaires exprimant les récepteurs correspondants. La migration des cellules au sein des tumeurs est également soumise à

régulation par les molécules d'adhésion CD44 et CD62L. CD44 est impliqué dans l'adhésion et la migration cellulaires et son ligand, l'acide hyaluronique, est un composé essentiel de la matrice extracellulaire tumorale. CD44 pourrait ainsi intervenir dans la migration des cellules à travers cette structure dense afin d'accéder aux cellules tumorales¹¹³. CD62L, également nommé L-sélectine, serait quant à lui impliqué dans la croissance tumorale et l'envahissement métastatique, en particulier par sa liaison à des ligands présents à la surface de cellules tumorales¹¹⁴. Des expériences réalisées au sein de notre laboratoire ont permis de démontrer la présence de tous les sous-types d'ILC dans le thymus, la rate, la moëlle osseuse, le petit intestin, le colon et les ganglions lymphatiques mésentériques, axillaires et inguinaux d'un individu sain récemment décédé (données non présentées ici). Le tropisme cellulaire des ILC est cependant intéressant à connaître afin de savoir, en particulier, si ces cellules pourraient migrer dans les tumeurs et ainsi participer au micro-environnement tumoral, mais aussi afin de déterminer si ces cellules, lors de transfert adoptif cellulaire systémique, pourraient migrer directement vers les tumeurs.

Nous avons donc procédé à des analyses de cytométrie en flux sur des ILC issues de sang périphérique de 16 donneurs sains afin de déterminer la présence de récepteurs aux chimiokines (CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR10, CXCR3, CXCR4, CX3CR1) et des molécules d'adhésion CD44 et CD62L à leur surface.

Les résultats obtenus ont permis d'établir une « carte » de la présence de ces molécules selon le sous-type cellulaire (Tableau 4 ; Figure 17, 18). En particulier, CCR10 et CCR2 sont absents de la surface de toutes les ILC, alors que CX3CR1, CXCR4, CCR1 et CCR7 y sont tous présents. Cependant, leurs niveaux d'expression varient selon le sous-type cellulaire. L'expression de CCR7 et CXCR4 est en effet la plus importante sur les ILC1, alors que celle de CCR1 est plus forte sur les cellules CD56⁺ NCR⁻, CD56⁺ NCR⁺, NCR⁺ ILC3 que sur les ILC1, les ILC2 et les LTi. Enfin, l'expression des récepteurs chimiokines peut être spécifique de certains sous-types d'ILC. Ainsi, celle de CCR6 et CCR4 sont respectivement spécifiques, d'une part, des ILC1, ILC2 et LTi et, d'autre part, des ILC2, alors que CXCR3 et CCR5 sont présents sur toutes les ILC exceptés les LTi et les ILC2. Enfin, tous les sous-types d'ILC expriment CD62L et CD44, même si le niveau d'expression de CD62L dépend du sous-type cellulaire. En effet, ce marqueur est plus faiblement exprimé par les ILC1 et les cellules

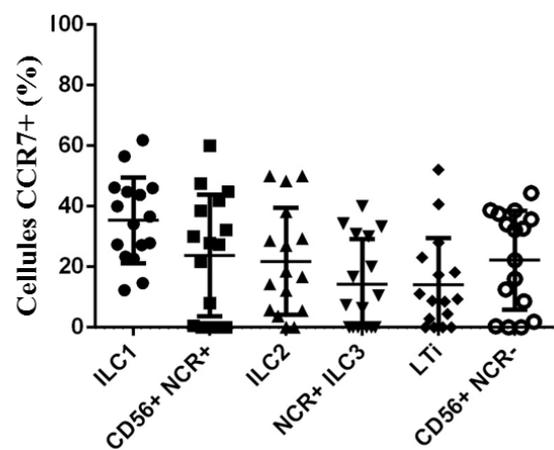
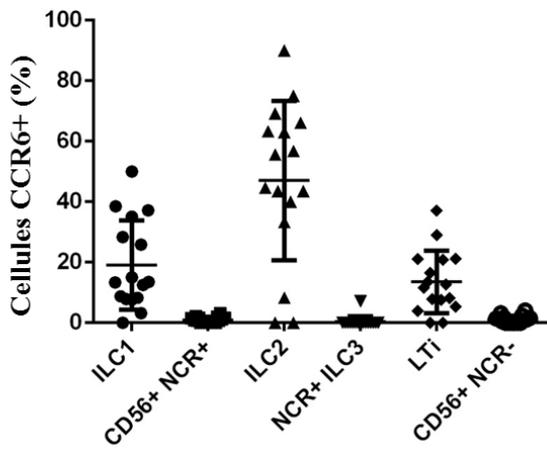
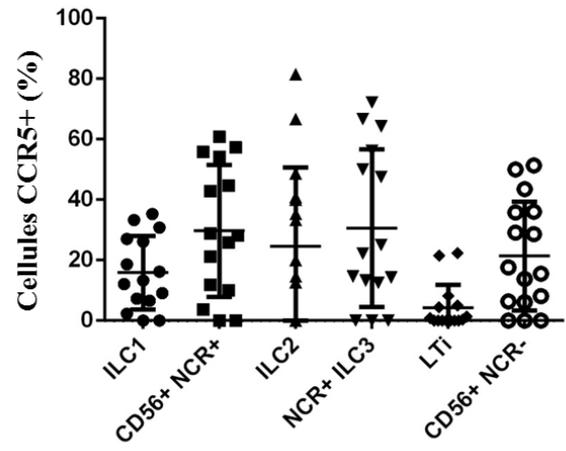
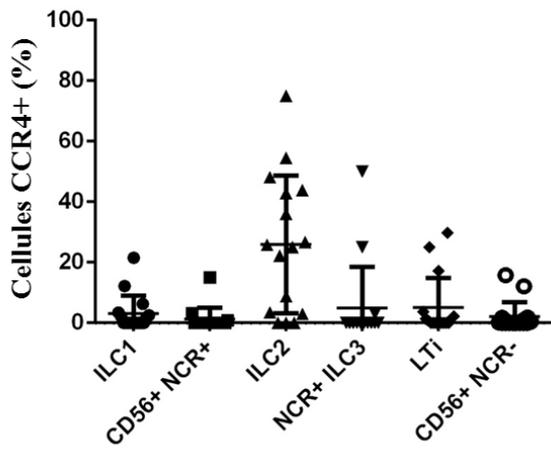
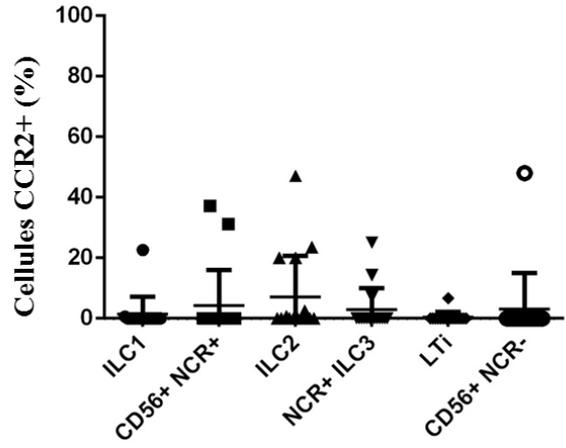
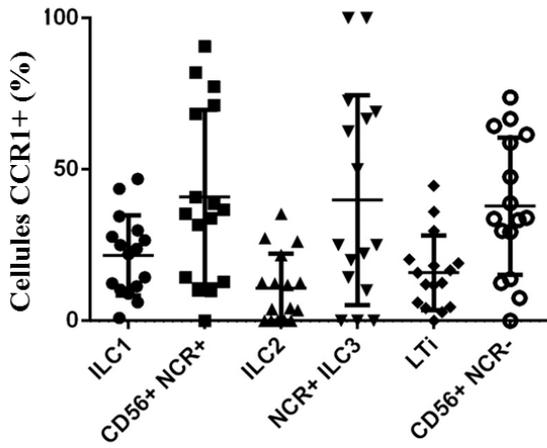
CD56⁺ NCR⁻ que par les autres ILC. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle de ces deux molécules dans la migration des ILC au site tumoral.

En conclusion, l'analyse phénotypique des ILC suggère un recrutement de ces cellules par la tumeur, qui dépendrait de la localisation du cancer et du sous-type cellulaire. Ce mécanisme migratoire ferait intervenir la voie des chimiokines mais aussi des molécules d'adhésion présentes à la surface de ces effecteurs cellulaires.

ILC périphériques en contexte sain		ILC1	CD56+ NCR+	ILC2	NCR+ ILC3	LTi	CD56+ NCR-
Potentiel Migratoire	CCR1	Faible	Intermédiaire	Faible	Intermédiaire	Faible	Intermédiaire
	CCR2	-	-	-	-	-	-
	CCR4	-	-	Faible	-	-	-
	CCR5	Faible	Faible	Faible	Faible	-	Faible
	CCR6	Faible	-	+	-	Faible	-
	CCR7	Intermédiaire	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible
	CCR10	-	-	-	-	-	-
	CX3CR1	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible
	CXCR3	Faible	Faible	-	Faible	Faible	Faible
	CXCR4	Intermédiaire	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible
Communication avec les cellules tumorales	CD44	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé
	CD62L	Faible	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Faible
	CD27	Elevé	Elevé	Faible	Faible	Faible	Faible
	CD70	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible
	TIM3	Faible	Elevé	-	Faible	Faible	Faible
	TACTILE	Faible	Intermédiaire	Intermédiaire	Elevé	Elevé	Faible
	Siglec7	Faible	Elevé	-	Elevé	Elevé	Elevé
	FasL	-	-	-	-	-	-
ILC et micro-environnement tumoral	Fas	+	+	+	+	+	+
	TRAIL	Faible	Elevé	Faible	Elevé	Intermédiaire	Elevé
ILC et micro-environnement tumoral	CD39	-	-	-	-	-	-
	CD73	Elevé	Intermédiaire	Intermédiaire	Intermédiaire	Intermédiaire	Intermédiaire
Activation des lymphocytes T	HLA-DR	-	Faible	-	Faible	Faible	Faible
	CD1c	-	-	-	-	-	-
	CD58	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé
	CD80	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible
	CD86	-	-	-	-	-	-
	CD40	-	-	-	-	-	-
Régulation par les cellules immunes	CD40L	-	-	-	-	-	-
	CD94	Faible	Elevé	-	Elevé	Faible	Elevé
	CD161	Faible	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé

Tableau 4. Phénotype des ILC dans le sang périphérique de donneurs sains.

Le niveau d'expression de divers marqueurs a été déterminé à la surface des ILC de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie en flux.



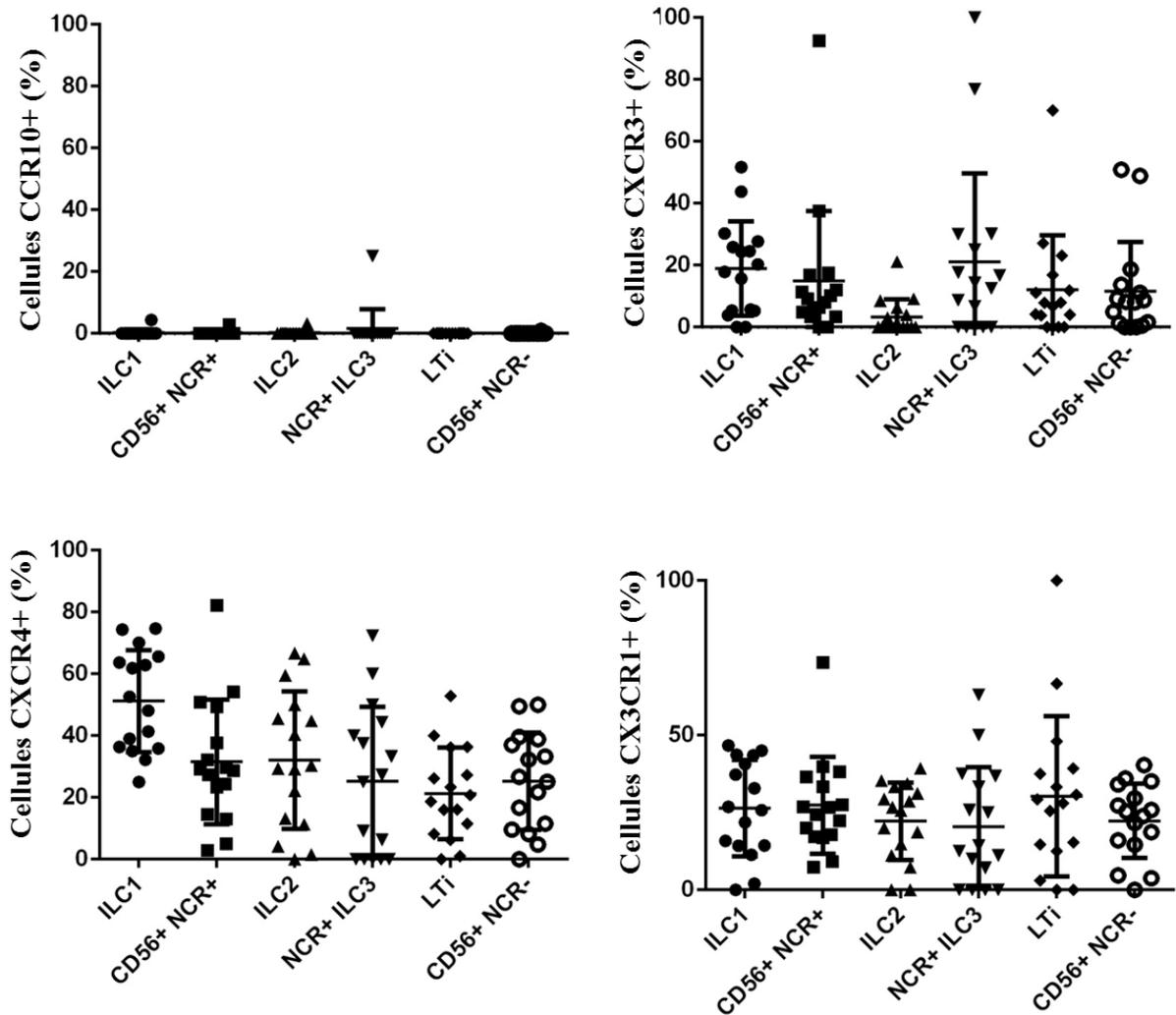


Figure 17. Détermination de l'expression des récepteurs aux chimiokines par les ILC.

Le niveau d'expression de CCR1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, CXCR3, CXCR4, CX3CR1 a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTI et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=16, âge 22-72, 2 hommes et 2 femmes par classe d'âge (0-29, 30-44, 45-59, plus âgés que 59 ans). Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

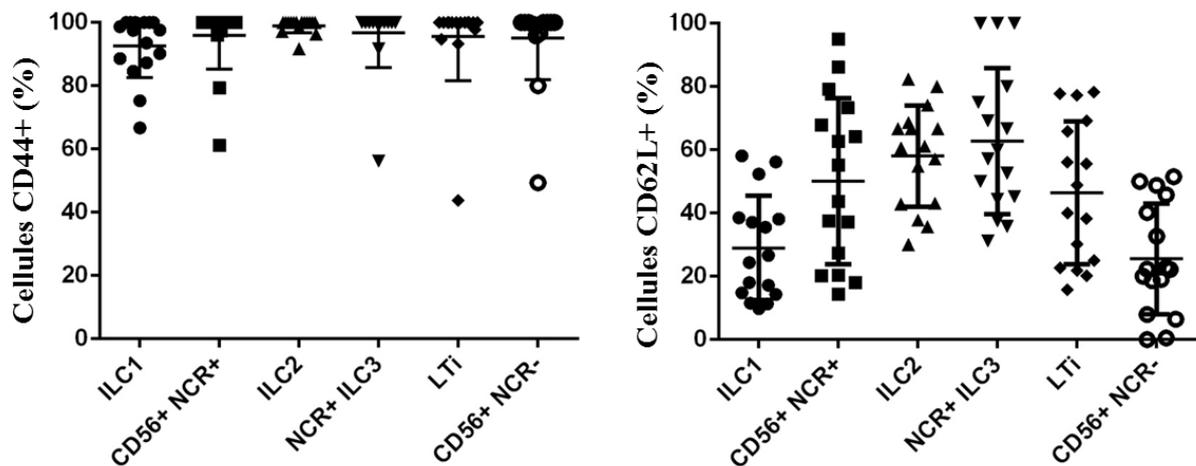


Figure 18. Détermination de l'expression des molécules d'adhésion CD44 et CD62L par les ILC.

Le niveau d'expression de CD44 et CD62L a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTI et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=16, âge 22-72, 2 hommes et 2 femmes par classe d'âge (0-29, 30-44, 45-59, plus âgés que 59 ans). Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

2.3.3 Communication entre les ILC et les cellules tumorales

Les résultats précédents suggérant la possible migration des ILC au site tumoral grâce à divers mécanismes, des expériences ont été mises en place afin de mieux comprendre comment ces cellules pourraient communiquer avec les cellules tumorales et, ainsi, influencer l'oncogénèse. Pour cela, quatre voies de signalisation ont été étudiées chez les ILC de sang périphérique chez l'Homme.

2.3.3.1 Via CD27/CD70

Le marqueur CD27, membre de la superfamille des récepteurs au TNF, et son ligand CD70 sont impliqués, physiologiquement, dans la réponse immune adaptative et innée. En effet, la voie de signalisation CD27/CD70 permet l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T, entre ces derniers et les lymphocytes B et, enfin, les liaisons cellulaires au sein des sous-populations lymphocytaires T ou B. De plus, ces marqueurs sont impliqués dans l'accumulation des lymphocytes T au site de l'infection, dans l'établissement d'une réponse mémoire lymphocytaire T et dans la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines¹¹⁵. CD27 et CD70 médient en outre les processus d'oncogénèse. Le ligand CD70 est exprimé, chez l'Homme, par des cellules de carcinome rénal, où sa présence est corrélée à une survie plus faibles des patients et par des cellules de carcinome thymique^{116,117}. Son récepteur CD27 est, quant à lui, présent sur les cellules leucémiques chroniques myéloïdes humaines, où il participe à la stimulation de la prolifération de celles-ci *via* l'activation de la voie de signalisation Wnt¹¹⁸. L'expression de ce marqueur est modulée, dans le lignage cellulaire B, lors de la différenciation des cellules. Ainsi, sa présence a été constatée sur des cellules leucémiques aiguës lymphoblastiques humaines et y est associée à un certain génotype de leucémie¹¹⁹. Les molécules CD27 et CD70 sont par conséquent exprimées de façon variable par les cellules tumorales, mais sont également impliquées dans l'activation de l'immunité contre ces cellules. L'étude d'un modèle murin de lymphome a tout d'abord permis de prouver que le marqueur CD70 des cellules tumorales permet de stimuler la cytotoxicité des cellules NK par l'induction de leur sécrétion de perforine et granzyme et de leur production d'IFN γ . L'IFN γ produit par les cellules NK grâce à la signalisation induite par la liaison à CD70 est, de plus, nécessaire pour l'établissement d'une réponse immune lymphocytaire T mémoire anti-tumorale¹²⁰. L'expression de CD27 a ensuite été constatée sur 60% des cellules NK présentes au sein du micro-environnement tumoral dans un modèle murin de mélanome. Ces cellules permettraient le contrôle précoce du processus de tumorigénèse *via*, notamment, la production d'IFN γ , alors que les lymphocytes T CD8 de la même origine exprimant eux aussi CD27 réguleraient la croissance tumorale¹²¹.

Aucune donnée n'est cependant référencée dans la littérature concernant la présence de ces deux molécules à la surface des ILC. Nous avons ainsi analysé l'expression des marqueurs CD27 et CD70 à la surface des ILC périphériques sanguines chez 32 donneurs sains par cytométrie en flux. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que les ILC sont CD27⁺ CD70⁺ (Tableau 4, Figure 19). Alors que toutes expriment faiblement CD70 indépendamment de leur sous-type, la présence de CD27 à leur surface est toutefois modulée selon les sous-groupes. Elle est ainsi forte sur les ILC1 et les cellules CD56⁺ NCR⁺ mais faible sur les ILC2, les LTi, les NCR⁺ ILC3 et les cellules CD56⁺ NCR⁻.

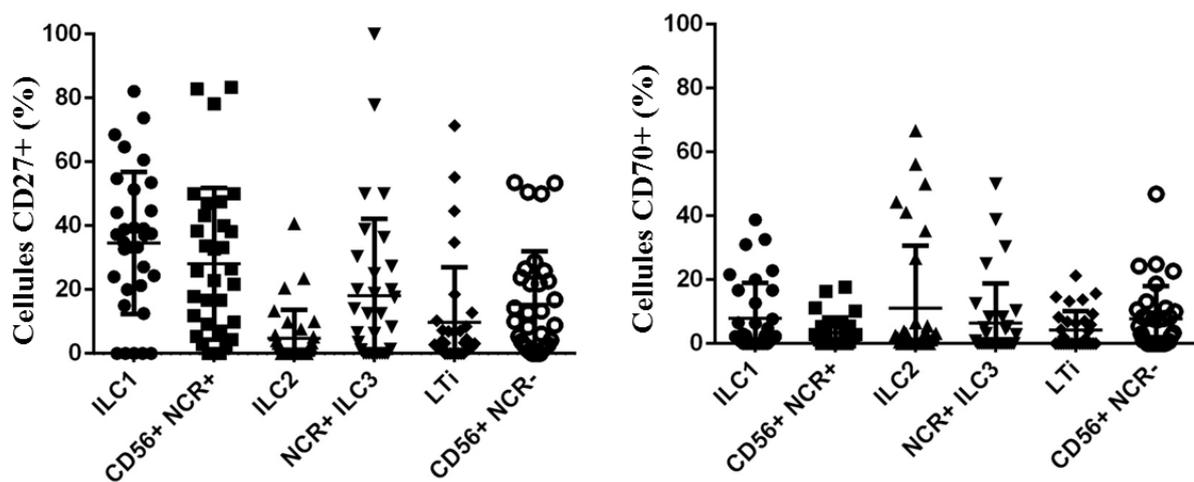


Figure 19. Détermination de l'expression de CD27 et CD70 par les ILC.

Le niveau d'expression de CD27 et CD70 a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTi et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=32, âge 20-72, 4 hommes et 4 femmes par classe d'âge (0-29, 30-44, 45-59, plus âgés que 59 ans). Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

La présence ubiquitaire de CD27 et CD70 sur les ILC suggère donc que ces marqueurs sont impliqués dans la communication entre les ILC et les cellules tumorales. Cette voie de signalisation pourrait autoriser ces dernières à moduler l'activation des ILC et, en particulier, leur cytotoxicité, mais aussi les ILC à établir une interaction avec les cellules tumorales afin de mieux induire leur apoptose.

2.3.3.2 Via TIM-3/Galectin-9

TIM-3 (*T-cell Immunoglobulin- and Mucin-containing- molecule-3*) est une glycoprotéine membranaire pouvant se lier à la forme soluble ou membranaire de Galectin-9. Son ligand Galectin-9 est exprimé dans certains cancers, en particulier par des cellules de leucémie myéloïde aiguë¹²² et de mélanome primaire au niveau protéique¹²³, ainsi que génétiquement par des cellules d'adénocarcinome et carcinome du colon et des cellules de métastases hépatiques et péritonéales dérivées de ces dernières¹²⁴. Galectin-9 est connu pour ses propriétés chémoattractrices des polynucléaires éosinophiles chez l'Homme¹²⁵ et agrégatives des cellules tumorales¹²³.

La liaison entre Galectin-9 et TIM-3, quant à elle, stimule la cytotoxicité des effecteurs de l'immunité innée et adaptative. En particulier, l'administration de Galectin-9 au site tumoral dans un modèle murin de fibrosarcome augmente la maturation des cellules dendritiques et, de façon corrélée, la production induite d'IFN γ par les lymphocytes T CD8¹²⁶. L'interaction entre ces deux molécules permet également de stimuler la production d'IFN γ par les cellules NK exprimant TIM-3¹²².

Chez l'Homme, TIM-3 est exprimé dans le sang périphérique, fortement sur les cellules NK CD3⁻ CD56⁺ (49% de cellules positives) mais plus faiblement sur les cellules NKT (6%) et les lymphocytes T (1%)¹²². La présence de TIM-3 est en effet nulle sur les lymphocytes T naïfs, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B mais augmentée après la différenciation des lymphocytes T en sous-type Th1¹²⁷. Cependant, l'expression de TIM-3 à la surface de ces cellules peut être modulée sous l'influence de son ligand ou de cytokines. L'administration de Galectin-9 chez la souris augmente, effectivement, la présence de TIM-3 à la surface des lymphocytes T CD8 ainsi que des cellules dendritiques matures¹²⁶. Le traitement de cellules NK par les cytokines IL-12 et IL-18 permet également d'amplifier l'expression de TIM-3 par ces dernières. En effet, toutes les cellules NK exprimant fortement CD56 surexpriment alors TIM-3 sous l'influence de ces cytokines, alors que les cellules NK exprimant faiblement CD56 peuvent être divisées en trois sous-groupes selon leur expression forte, faible ou nulle de TIM-3 à leur surface¹²². Quant aux lymphocytes T, le marqueur TIM-3 est surexprimé à leur surface lors d'épuisement de ces cellules par stimulation chronique, lors de cancer par exemple⁷. TIM-3 appartient effectivement à la famille des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T, au même titre que les

marqueurs CTLA-4, PD-1 et BTLA. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de surexpression de ces quatre récepteurs par les ILC du sang périphérique lors de cancer, par comparaison avec les données obtenues chez les donneurs sains (données ici non présentées).

Les données préliminaires recueillies sur les ILC nous ont amené à nous questionner sur l'implication de la voie TIM-3/Galectin-9 dans la communication des ILC avec les cellules tumorales. Nous avons ainsi déterminé la présence de TIM-3 à la surface des ILC par cytométrie en flux chez 16 donneurs sains (Tableau 4 ; Figure 20). Les résultats obtenus démontrent que l'expression de TIM-3 sur les ILC dépend de leur sous-type. En effet, celle-ci est importante sur les cellules CD56⁺ NCR⁺, faible sur les ILC3, les LTi, les ILC1 et les cellules CD56⁺ NCR⁻ et nulle sur les ILC2.

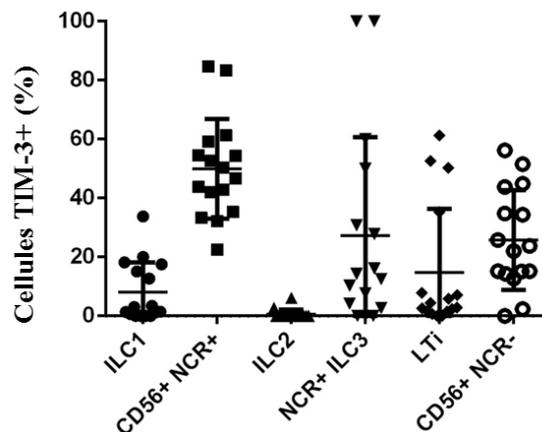


Figure 20. Détermination de l'expression de TIM-3 par les ILC.

Le niveau d'expression de TIM-3 a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTi et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=16, âge 20-67, 2 hommes et 2 femmes par classe d'âge (0-29, 30-44, 45-59, plus âgés que 59 ans). Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

En conclusion, les ILC de groupes 1 et 3 pourraient interagir, *via* leur récepteur TIM-3, avec des cellules tumorales exprimant Galectin-9, telles que des cellules de cancer du côlon, de leucémie aiguë ou encore de mélanome. Étant donné les effets déjà connus de la stimulation de la cytotoxicité des cellules NK par les cellules tumorales portant Galectin-9, un modèle de modulation de l'activité anti-tumorale des ILC de groupe 1 et 3 par ces cellules tumorales peut ainsi être proposé.

2.3.3.3 Via CD155/Tactile

Les cellules tueuses naturelles NK portent, à leur surface, différents récepteurs inhibiteurs, tels que CD226, TIGIT (*T-cell Immunoglobulin- and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-domain*) et TACTILE (*T-cell activation, increased late expression*), également nommé CD96. Tous se lient à diverses molécules mais partagent le ligand CD155, récepteur du poliovirus. L'interaction entre CD155 et Tactile aboutit à l'adhésion des cellules portant ces molécules et à l'échange, entre elles, de molécules membranaires¹²⁸. Chan et al. ont également démontré chez la souris que CD155 régule la fonction des cellules NK CD96+¹²⁹. En effet, l'administration de lipopolysaccharide chez ces animaux induit l'expression de CD155 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. La production d'IFN γ lorsque les cellules NK CD96+ interagissent avec ces cellules présentatrices d'antigènes est alors diminuée par rapport au contexte physiologique murin dans lequel aucun lipopolysaccharide n'est administré.

CD155 est exprimé dans de nombreux tissus cancéreux humains : par des cellules de carcinome colo-rectal¹³⁰, de gliome¹³¹, de carcinome du sein, de la prostate, du rein, du pancréas, du colon, des ovaires, des poumons non à petites cellules¹³² ainsi que par des cellules de carcinome bronchioalvéolaire. La présence de CD155 sur ces dernières est corrélée à une survie plus faible des patients¹³³.

Le rôle des voies de signalisation impliquant Tactile dépend des types de cancers. D'une part, celles-ci protègent de la formation de métastases mais pas de la croissance de la tumeur primaire dans un modèle murin de mélanome. D'autre part, elles inhibent la formation de fibrosarcome chez les souris par augmentation de la cytotoxicité anti-tumorale des cellules NK¹²⁹.

Il est intéressant d'évaluer la potentielle implication de cette voie de signalisation dans la médiation de l'oncogénèse par les ILC. Nous avons ainsi analysé par cytométrie en flux la présence de ce marqueur à la surface des ILC du sang périphérique de cinq donneurs sains (Tableau 4 ; Figure 21). L'existence de cette molécule a été mise en évidence sur tous les sous-types cellulaires, même si son expression est plus faible sur les ILC1 et les cellules CD56⁺ NCR⁻ que sur les ILC de groupe 2, de groupe 3 et sur les CD56⁺ NCR⁺.

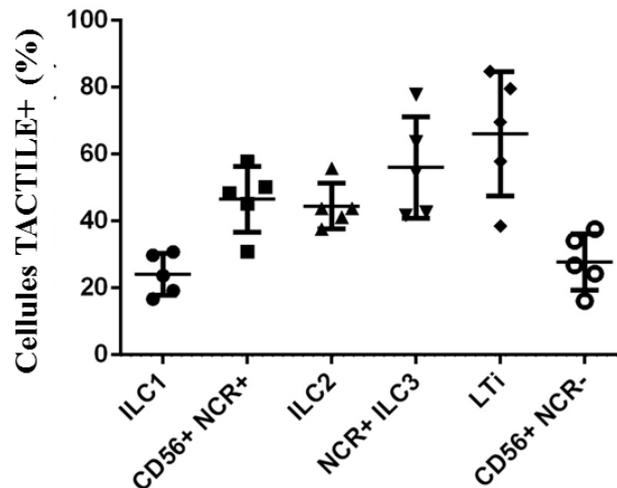


Figure 21. Détermination de l'expression de TACTILE par les ILC.

Le niveau d'expression de TACTILE a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTi et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=5, âge 28-64 (moyenne 50 ans), femmes:hommes 4:1. Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

Ces données suggèrent que les ILC, en cas de présence rapprochée avec les nombreuses cellules tumorales exprimant CD155, pourraient établir un contact avec celles-ci *via* l'interaction entre Tactile et ce marqueur. Une modulation de l'activité des ILC pourrait alors s'ensuivre et participer à la régulation de l'immunité anti-tumorale.

2.3.3.4 *Via Siglec-7 et ses ligands*

Après avoir étudié la présence du récepteur inhibiteur TACTILE sur les ILC, nous nous sommes intéressés à la potentielle régulation de ces cellules par la voie Siglec-7. Siglec-7 est un récepteur aux acides sialiques porté, en particulier, par les cellules NK. De façon intéressante, ses ligands sont exprimés par les cellules tumorales lors de diverses pathologies malignes telles que le mélanome, les cancers du pancréas et du colon, les leucémies et les cancers cervicaux. Jandus et al. ont démontré, *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins de cancer cervical et de leucémie, que l'interaction entre Siglec-7 sur les cellules NK et ses

ligands sur les cellules tumorales inhibe la cytotoxicité anti-tumoral médiée par les cellules NK en diminuant leur production d'IFN γ ¹³⁴.

Nous pouvons cependant nous demander, étant donné l'absence de ces renseignements dans la littérature, si ce phénomène s'applique seulement aux cellules NK ou également aux autres sous-types d'ILC. Nous avons ainsi analysé la présence de Siglec-7 à la surface de ces cellules par cytométrie en flux dans le sang périphérique de seize donneurs sains (Tableau 4 ; Figure 22). Les données obtenues ont permis de conclure que Siglec-7 est exprimé très fortement par les ILC CD56⁺ NCR⁺ ainsi que celles de groupe 3, alors que la présence de cette molécule est très faible sur les ILC1 et nulle sur les ILC2.

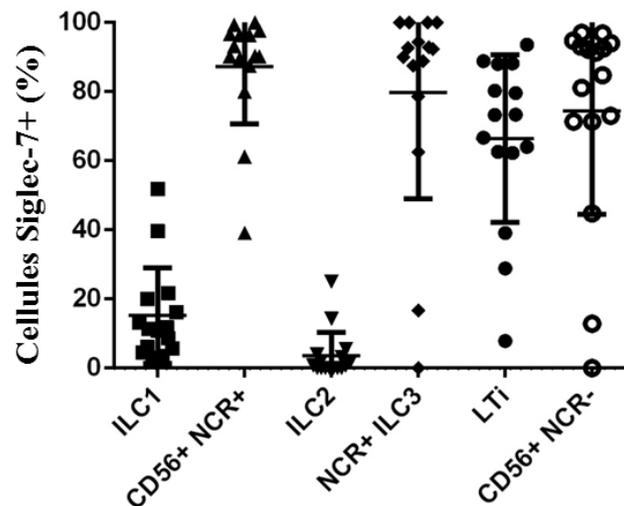


Figure 22. Détermination de l'expression de Siglec-7 par les ILC.

Le niveau d'expression de Siglec-7 a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTI et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=16, âge 20-68, 2 hommes et 2 femmes par classe d'âge (0-29, 30-44, 45-59, plus âgés que 59 ans). Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

L'expression de ligands de Siglec-7 par certaines cellules tumorales pourrait, par conséquent, entraîner une modulation de la fonction des ILC de groupes 1 et 3 portant le récepteur correspondant et recrutées dans le micro-environnement tumoral.

2.3.3.5 Via la voie des récepteurs de mort cellulaire

Le dernier moyen de communication entre les ILC et les cellules tumorales que nous décrivons ici concerne la voie des récepteurs de mort cellulaire. L'apoptose consiste en la mort cellulaire programmée des cellules et peut être induite de diverses manières, dont par la signalisation induite par les récepteurs de mort cellulaire. Ceux-ci appartiennent à la super-famille des récepteurs du TNF (*Tumor Necrosis Factor*), qui comprend Fas (CD95) et Trail (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*).

2.3.3.5.1 Fas

Un premier exemple de ces récepteurs de mort cellulaire est Fas (CD95). Lors de sa liaison à son ligand membranaire ou trimérique soluble, Fas induit l'apoptose de la cellule sur lequel il est exprimé. Cette interaction entraîne effectivement un changement de conformation du domaine intracellulaire de Fas aboutissant au recrutement de molécules de mort FADD (*Fas-associated protein with death domain* : Protéine associée à Fas portant des domaines de mort cellulaire) et des caspases 8 et 10. S'ensuit l'auto-activation de ces dernières, puis de la caspase 3, dont découlent finalement l'apoptose de la cellule (Figure 23).

FasL peut être présent à la surface de cellules tumorales¹³⁵ ou au sein de vésicules membranaires internes. Certaines cellules de mélanome peuvent ainsi sécréter des mélanosomes contenant FasL, induisant l'apoptose des cellules portant Fas dans le milieu environnant¹³⁶. Mais la présence de FasL dans le micro-environnement tumoral n'est pas restreinte aux cellules tumorales : celle-ci peut être induite sur les cellules endothéliales des vaisseaux irriguant les tumeurs primaires et métastatiques sous l'influence de facteurs dérivés de tumeurs tels que l'IL-10, la prostaglandine E2 et le facteur de croissance endothélial vasculaire de type A. Ce phénomène a ainsi été démontré lors de cancers des ovaires, du côlon, de la prostate, du sein, du rein et de la vessie. Les cellules endothéliales FasL⁺ acquièrent alors la capacité de lyser les lymphocytes T effecteurs mais non les lymphocytes T régulateurs, résistants à ce mécanisme de cytotoxicité. Une immunosuppression locale est progressivement mise en place dans le micro-environnement tumoral par l'élimination de lymphocytes T effecteurs et l'accumulation de lymphocytes T régulateurs¹³⁷.

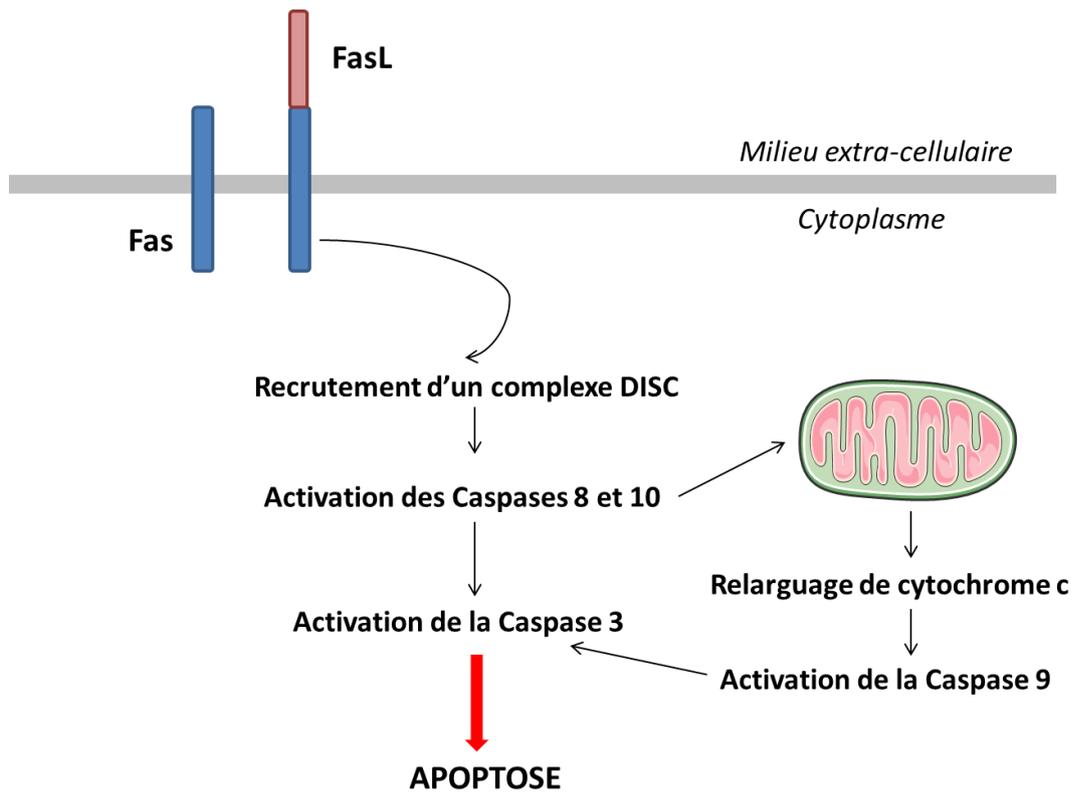


Figure 23. Voie de signalisation de Fas/FasL.

L'interaction de Fas avec son ligand induit un recrutement d'un complexe DISC aboutissant à l'activation des caspases 8 et 10 puis de la caspase 3 de façon directe ou indirecte *via* la voie mitochondriale et l'activation de la caspase 9. En découle alors l'apoptose de la cellule.

Afin de mieux évaluer leur potentiel en tant que candidat à l'immunothérapie adoptive anti-tumorale, il est nécessaire de savoir si les cellules tumorales peuvent détruire ou être détruites par les ILC. Nous avons ainsi analysé par cytométrie en flux la présence de Fas (CD95) et FasL à la surface des ILC issues de sang périphérique de, respectivement, trois et cinq donneurs sains. Les données collectées ont permis de démontrer que toutes les ILC, indépendamment de leur sous-type, expriment Fas mais non son ligand, FasL (Tableau 4 ; Figure 24).

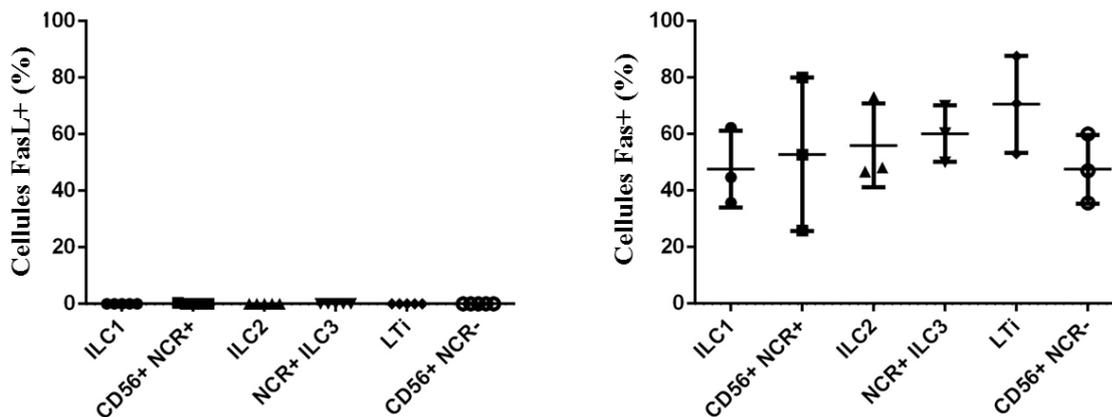


Figure 24. Détermination de l'expression de Fas (CD95) et FasL par les ILC.

Le niveau d'expression de Fas (CD95) et FasL a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTI et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. CD95: Donneurs sains: n=3 femmes, âge 45-48 (moyenne 46). FasL: Donneurs sains: n=5, âge 28-64 (moyenne 50 ans), femmes:hommes 4:1. Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

L'interaction entre les ILC et les cellules FasL⁺ tumorales ou endothéliales tapissant la microvascularisation tumorale pourrait, en conclusion, aboutir à l'apoptose des ILC grâce à leur expression du récepteur de mort cellulaire Fas. Cependant, les ILC ne sont pas capables d'utiliser la voie de signalisation Fas/FasL afin d'induire une lyse tumorale car ne portent pas FasL à leur surface.

2.3.3.5.2 Trail

Un second représentant de la voie des récepteurs de mort cellulaire est Trail, dont la liaison avec ses récepteurs peut induire une apoptose de la cellule cible. Ses principaux récepteurs sont, chez l'Homme, les « death receptors » DR4 et DR5 ainsi que les « decoy receptors » DcR1 et DcR2. La liaison d'homotrimères de Trail avec DR4 ou DR5 induit la trimérisation de ces récepteurs et la formation d'un complexe de mort cellulaire autorisant le recrutement de molécules FADD puis l'enrôlement et l'activation de la caspase 8, aboutissant à l'apoptose de la cellule. DR4 et DR5 sont ainsi pro-apoptotiques alors que DcR1 sont anti-

apoptotiques car inhibent le mécanisme de signalisation induit par la liaison de DR4 ou DR5 avec TRAIL (Figure 25)¹³⁸.

DR4 et/ou DR5 sont exprimés par certaines cellules tumorales chez l'Homme, notamment lors de cancer de la vessie, du poumon non à petites cellules et du colon et peuvent constituer des facteurs de pronostic de ces pathologies¹³⁹⁻¹⁴¹. L'ilimaquinone, molécule anti-cancéreuse, permet en outre d'augmenter l'expression de ces récepteurs sur des lignées cellulaires humaines de cancer du côlon et, ainsi, de potentialiser la sensibilité de ces cellules à la lyse médiée par TRAIL¹⁴². L'interaction entre des effecteurs immuns portant TRAIL et des cellules tumorales DR4⁺ et/ou DR5⁺ peut en effet aboutir à la lyse tumorale. L'induction de l'expression de TRAIL sur les cellules NK hépatiques par l'IFN γ endogène est notamment impliquée, dans des modèles murins de tumeurs DR5⁺, dans la cytotoxicité des cellules NK et, parallèlement, dans la régression des métastases par celles-ci¹⁴³.

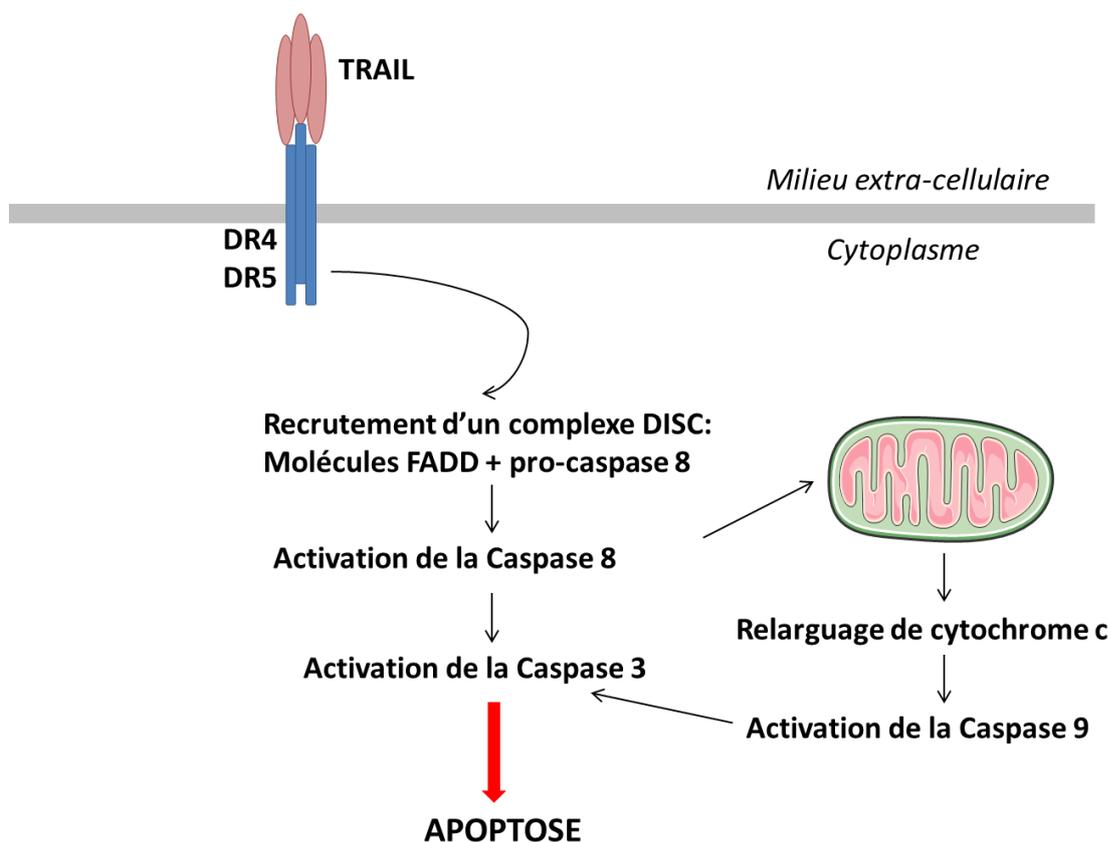


Figure 25. Voie de signalisation de Trail.

La liaison de Trail avec DR4 et DR5 induit le recrutement de molécules FADD et de pro-caspase 8, puis l'activation cette dernière, aboutissant à l'activation de caspase 3. Celle-ci peut être directe ou indirecte *via* la voie mitochondriale, et aboutit à l'apoptose de la cellule.

La présence de TRAIL à la surface des divers sous-types d'ILC n'est cependant pas encore connue. Nous avons ainsi déterminé l'expression de ce marqueur sur les ILC issues du sang périphérique de cinq donneurs sains par cytométrie en flux. Toutes les ILC portent cette molécule selon les résultats obtenus, même si son niveau d'expression dépend du sous-type cellulaire (Tableau 4 ; Figure 26). Celui-ci est en effet faible pour les ILC1 et les ILC2, intermédiaire pour les LTi et fort pour les cellules CD56⁺ NCR⁺ et les cellules NCR⁺ ILC3 et CD56⁺ NCR⁻.

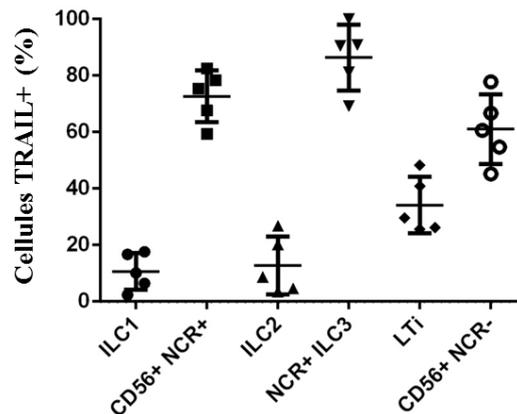


Figure 26. Détermination de l'expression de TRAIL par les ILC.

Le niveau d'expression de TRAIL a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTi et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=5, âge 28-64 (moyenne 50 ans), femmes:hommes 4:1. Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

Ces renseignements quant à l'expression du ligand de récepteurs de mort cellulaire TRAIL à la surface des ILC soulèvent l'hypothèse de l'existence d'une lyse tumorale par les ILC impliquant, en particulier, les ILC de groupe 3 ainsi que celles de phénotype CD56⁺ NCR^{+/-}.

Suite à leur migration au site tumoral, les ILC pourraient donc interagir avec les cellules transformées et les lyser selon diverses méthodes dépendant du type de cancer et du sous-type d'ILC recruté. Cependant, la migration au site tumoral des ILC suppose également une influence de ces dernières sur le recrutement tumoral et l'activité des cellules immunitaires. La prochaine partie traite ainsi de l'implication des ILC dans l'immunosuppression médiée par le micro-environnement tumoral.

2.3.4 ILC et micro-environnement tumoral

Les marqueurs CD39 et CD73 sont deux ectoenzymes impliquées dans la déphosphorylation de l'ATP en adénosine (Figure 27). La première transforme l'ATP en ADP puis l'ADP en AMP de façon réversible grâce à l'adénylate kinase et la NDP kinase. CD73 est l'enzyme clé de cette voie de métabolisme car dégrade l'AMP en adénosine de façon irréversible dans le milieu extra-cellulaire. La présence des molécules CD39 et de CD73 à la surface des cellules détermine ainsi la balance entre ATP et adénosine dans le milieu extra-cellulaire, importante étant donné les effets opposés de ces deux molécules. Alors que l'ATP est un signal de danger témoignant d'une lésion cellulaire, sa liaison à des récepteurs purinergiques peut activer la voie des inflammasomes et aboutir à la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules dendritiques, stimulant les cellules NK, les lymphocytes T et les macrophages. L'adénosine, au contraire, est immunosuppressive, car interagit avec les récepteurs couplés à la protéine G portés par les lymphocytes T et B, les cellules NK et NKT, les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes afin d'inhiber la fonction de ces cellules¹⁴⁴.

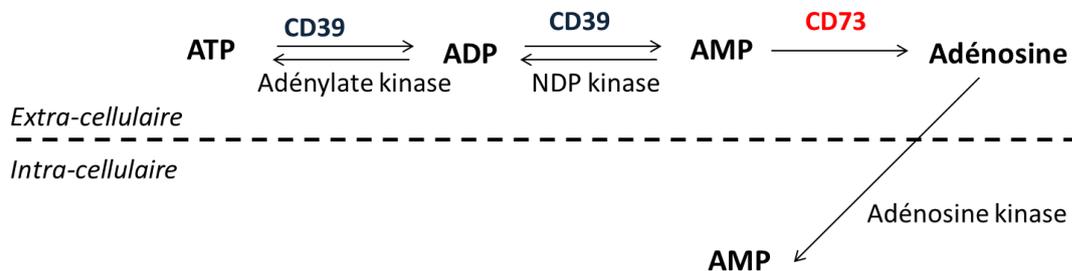


Figure 27. Ectoenzymes et kinases extra-cellulaires impliquées dans la génération d'adénosine. ATP est transformée en adénosine immunosuppressive *via* l'ADP et l'AMP par les ectoenzymes CD39 et CD73. Le catabolisme de l'ATP en AMP est réversible grâce à l'adénylate kinase et la NDP kinase, alors que la conversion d'AMP en adénosine est réversible uniquement par l'enzyme intra-cellulaire adénosine kinase.

L'enzyme CD39 est présente sur de nombreuses cellules telles que les cellules NK, les monocytes, les lymphocytes T activés et les cellules dendritiques¹⁴⁵. L'expression du marqueur CD73 est, quant à elle, préférentielle des cellules suppressives myéloïdes, des lymphocytes T régulateurs et des lymphocytes Th17, et confère à ces cellules leurs propriétés

immunosuppressives¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. CD73 est enfin porté par les cellules tumorales dans de nombreux contextes cancéreux chez l'Homme¹⁴⁴.

La présence de ces ectoenzymes sur les ILC n'est pas encore renseignée dans la littérature mais serait intéressante à connaître, afin de savoir si les ILC peuvent utiliser ces mécanismes de dégradation afin d'influer sur la mise en place de la réponse immune tumorale.

Nous avons ainsi analysé par cytométrie en flux l'expression de CD39 et CD73 sur les ILC issues du sang périphérique de cinq donneurs sains. Les résultats obtenus permettent de constater l'absence de CD39 et la présence de CD73 sur toutes les ILC (Tableau 4 ; Figure 28). CD73 est cependant exprimé plus fortement par les ILC1, les ILC2, les LTI et les cellules CD56⁺ NCR⁻ que sur les cellules CD56⁺ NCR⁺ et les NCR⁺ ILC3. Il est également important de relever qu'aucun sous-type d'ILC ne co-exprime CD39 et CD73, étant donné l'absence de CD39 à leur surface.

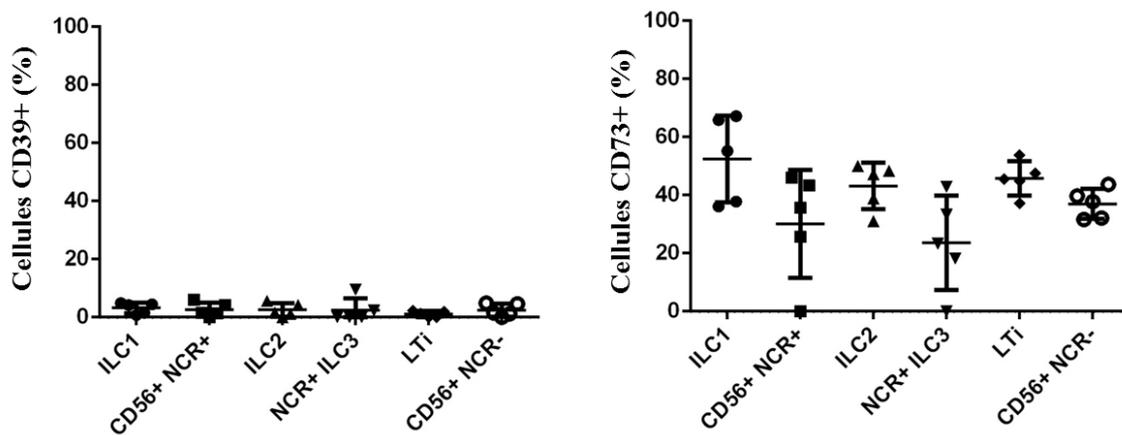


Figure 28. Détermination de l'expression des ecto-enzymes CD39 et CD73 par les ILC.

Le niveau d'expression de CD39 et CD73 a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTI et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=5, âge 28-64 (moyenne 50 ans), femmes:hommes 4:1. Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

Nos observations suggèrent par conséquent une potentielle implication des ILC dans l'induction d'un micro-environnement tumoral immunosuppresseur. En effet, même si ces

cellules n'expriment pas CD39, elles expriment toutes CD73, qui est l'enzyme clé de la dégradation de l'ATP en adénosine. Ainsi, présentes dans un milieu contenant de l'AMP, c'est-à-dire dans un micro-environnement tumoral riche en cellules NK, monocytes, lymphocytes T activés ou cellules dendritiques, les ILC pourraient contribuer à la modulation de la réponse immune anti-tumorale par la transformation d'AMP en adénosine.

2.3.5 Les ILC : activatrices du système immunitaire et régulées par celui-ci ?

Des travaux récents documentent l'effet de certains sous-types d'ILC sur la réponse immune adaptative et innée (cf 1.2.3.3 et 1.2.3.4). Ainsi, nous avons recherché l'expression de marqueurs impliqués dans l'activation d'effecteurs cellulaires adaptatifs et des cellules NK.

2.3.5.1 Possible rôle des ILC dans l'activation des lymphocytes T

L'activation de certaines cellules immunitaires est médiée par la reconnaissance d'un antigène porté par une molécule présentatrice. Le marqueur CD1c est ainsi une molécule non polymorphique qui assure la présentation de lipides aux lymphocytes T¹⁴⁹, alors que CD1d présente des antigènes glycolipidiques aux cellules NKT¹⁴⁹ et que les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses peuvent détecter des métabolites de la vitamine B associés à MR1¹⁵⁰. Au contraire, les molécules du CMH, portées en particulier par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), forment un complexe avec des antigènes peptidiques qui peut être reconnu par le récepteur TCR des lymphocytes T (Figure 29). Ce phénomène est renforcé par l'interaction entre la CPA et le lymphocyte grâce à la liaison de CD58 sur la CPA au récepteur CD2 du lymphocyte¹⁵¹. L'activation du lymphocyte T ne sera cependant effective qu'en cas de délivrance d'un signal de co-stimulation par la CPA, tel que l'interaction de ses marqueurs CD80 et CD86 avec les récepteurs lymphocytaires CTLA-4 et CD28. Ces derniers, bien que partageant les mêmes ligands, n'ont pas le même rôle, CTLA-4 délivrant un signal d'inhibition et CD28 un signal d'activation au lymphocyte¹⁵¹. Un

deuxième signal de co-stimulation du lymphocyte T consiste en la liaison entre CD40 sur la CPA et son ligand, CD40L, sur le lymphocyte¹⁵². Cette voie de signalisation est aussi impliquée dans la génération de la réponse B mémoire, dans l'expansion des lymphocytes B ainsi que dans la création des centres germinaux¹⁵³.

Les cellules lymphoïdes innées de groupe 2 extraites de la rate, des ganglions lymphatiques ou des plaques de Peyer sont déjà connues pour exprimer des molécules du CMHII. Ce phénotype leur permet d'activer les lymphocytes T grâce à la présentation de peptides antigéniques mais également par la délivrance de signaux de co-stimulation *via* CD80 et CD86 (cf partie 1.2.3.5.1).

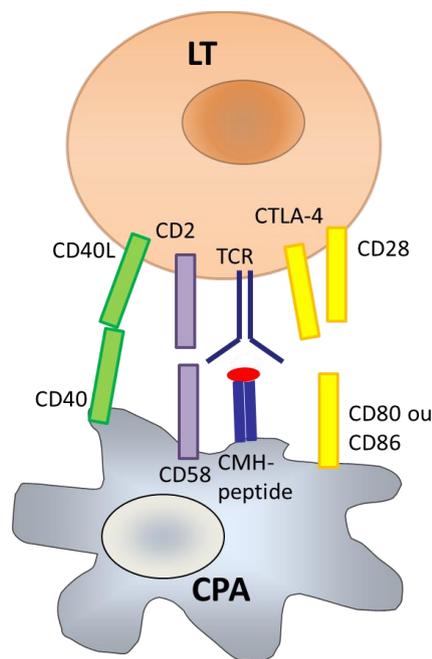
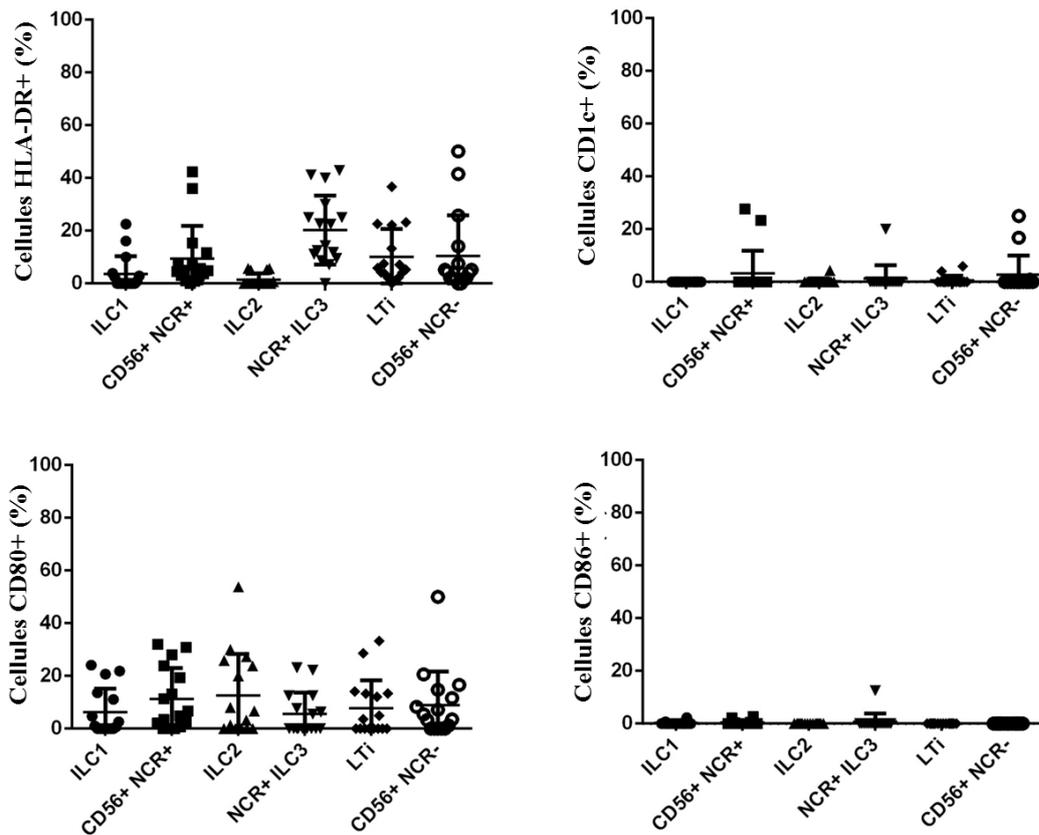


Figure 29. Synapse immunologique de présentation antigénique par les CPA aux lymphocytes T. Les CPA peuvent interagir, dans les tissus lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques, avec les lymphocytes T et leur délivrer un signal d'activation *via* l'interaction entre le TCR et le complexe CMH-peptide. Cette liaison peut être renforcée par l'interaction entre CD58 et CD2. Des signaux de co-stimulation activateurs ou inhibiteurs peuvent aussi être délivrés, par la liaison de CD80 ou CD86 avec, respectivement, CD28 ou CTLA-4 ou par la liaison de CD40 à CD40L.

Aucune publication ne documente, toutefois, la présence de molécules présentatrices d'antigènes et de co-stimulation à la surface de l'ensemble des sous-types d'ILC.

Par conséquent, nous avons déterminé l'expression des marqueurs CD1c, CMHII, CD80, CD86, CD58, CD40 et CD40L à la surface des ILC du sang périphérique chez seize donneurs sains (Tableau 4 ; Figure 30). Les données obtenues ont permis de démontrer la

présence de CMHII à un faible niveau sur les NCR⁺ ILC3 et à un niveau très faible sur les LTIi et les cellules CD56⁺ NCR^{+/-}. CD1c est, quant à lui, absent de la surface de tous les sous-types cellulaires, tandis que CD58 est présent très fortement sur toutes les ILC, indépendamment de leur sous-type. Les molécules de costimulation CD80 et CD86 sont respectivement exprimées faiblement par toutes les ILC et absentes de celles-ci. Enfin, les ILC ne sont pas pourvues, à leur surface, des marqueurs CD40 et CD40L.



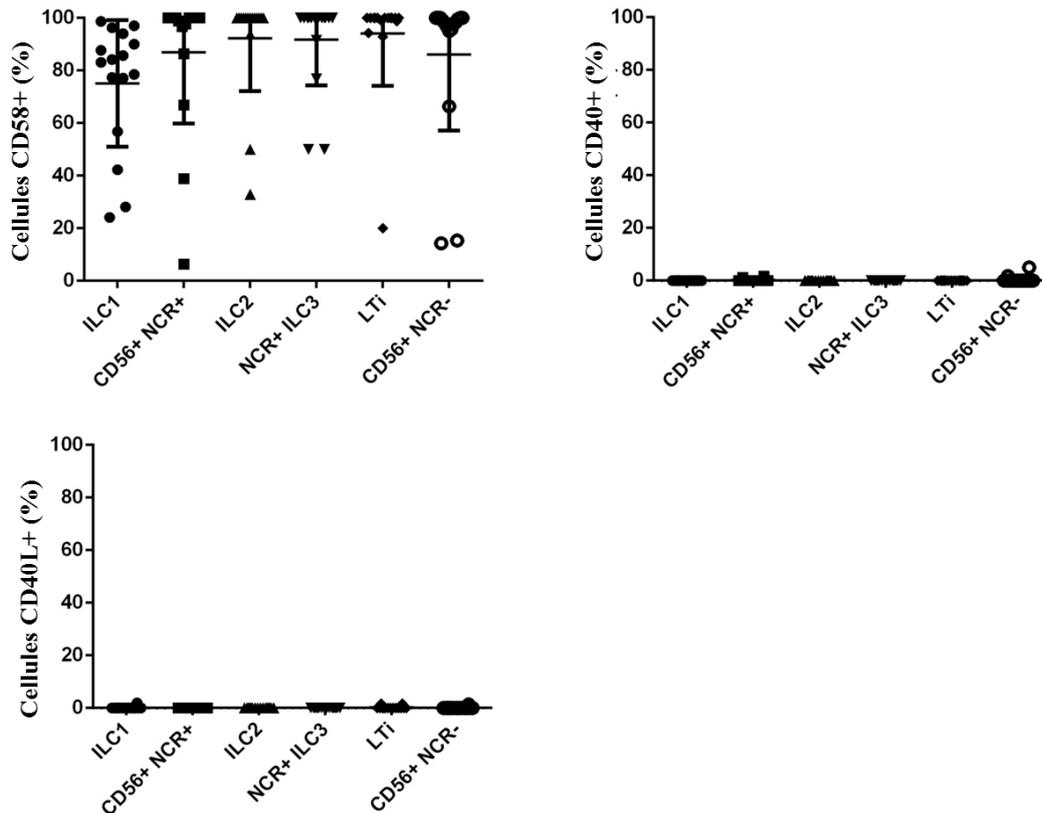


Figure 30. Détermination de l'expression de molécules d'activation des lymphocytes T et B par les ILC.

Le niveau d'expression de CD1c, HLA-DR (CMHII), CD80, CD86, CD40 et CD40L a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTI et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=16, âge 22-72, 2 hommes et 2 femmes par classe d'âge (0-29, 30-44, 45-59, plus âgés que 59 ans). Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

Ces résultats attestent premièrement de l'incapacité des ILC à présenter des antigènes non peptidiques *via* CD1c. Deuxièmement, les ILC participeraient à l'activation des lymphocytes T. En particulier, les cellules CD56⁺ NCR⁺, les cellules CD56⁺ NCR⁻ et les ILC de groupe 3 seraient capables de présenter des antigènes peptidiques à leur surface grâce à l'expression des molécules HLA II. L'interaction réalisée entre ces cellules et les lymphocytes T serait renforcée par l'interaction entre CD58 et CD2. De plus, un signal de co-stimulation serait délivré par les ILC *via* CD80. Cependant, la voie CD40/CD40L n'intervient pas dans l'interaction des ILC avec les lymphocytes T ou B. Il serait enfin intéressant d'étudier l'effet de l'activation des ILC sur l'expression des molécules de présentation d'antigènes.

2.3.4.2 Modulation de la fonction des ILC par les cellules immunitaires

Les cellules NK possèdent un panel de récepteurs activateurs, inhibiteurs ou sans domaine de signalisation à leur surface, parmi lesquels CD94 et CD161. CD94 est un récepteur n'induisant pas de signalisation intracellulaire. CD94 et le complexe CD94 : NKG2A inhibent les cellules NK lorsqu'ils se lient avec le complexe HLA-E : peptide présent sur les cellules¹⁵⁴. À l'opposé, CD94 : NKG2E : NKG2D fournit un signal de stimulation la fonction des cellules NK, chez la souris, lorsqu'il interagit avec des cellules HLA-E+ infectées de façon virale¹⁵⁵.

Le marqueur CD161 est, contrairement à CD94, un récepteur inhibiteur des cellules NK. Sa liaison avec son ligand, LST1 (*Lectin-like transcript-1* : Transcrit 1 de type lectine), protège en effet la lyse des cellules LST1⁺ par les cellules NK CD161⁺ en diminuant la production d'IFN γ par ces dernières¹⁵⁶. La molécule LST1 est physiologiquement portée par les lymphocytes B activés, les cellules NK ainsi que les cellules dendritiques activées¹⁵⁷. Cependant, LST1 peut être également présent sur des cellules tumorales humaines, en particulier lors de gliomes, où son niveau d'expression augmente avec le stade de la maladie. Ce phénomène participe ainsi à l'immunosuppression induite par la tumeur, *via* l'inhibition de la cytotoxicité anti-tumorale médiée par les cellules NK¹⁵⁸.

Cependant, la présence de ces deux récepteurs à la surface des ILC n'est pas documentée et constitue des données intéressantes pour la meilleure compréhension de la régulation de la fonction des ILC par les cellules du système immunitaire.

Nous avons donc déterminé le niveau d'expression de CD94 et CD161 à la surface des divers sous-types d'ILC du sang périphérique de seize donneurs (Figure 31). Il est intéressant de noter que le niveau d'expression de CD94 est élevé pour les cellules CD56⁺ NCR^{+/-} et les NCR⁺ ILC3, faible pour les ILC1 et les LTi et nul pour les ILC2. Quant à CD161, son degré de présence est intermédiaire pour les ILC1 et élevé pour le reste des ILC.

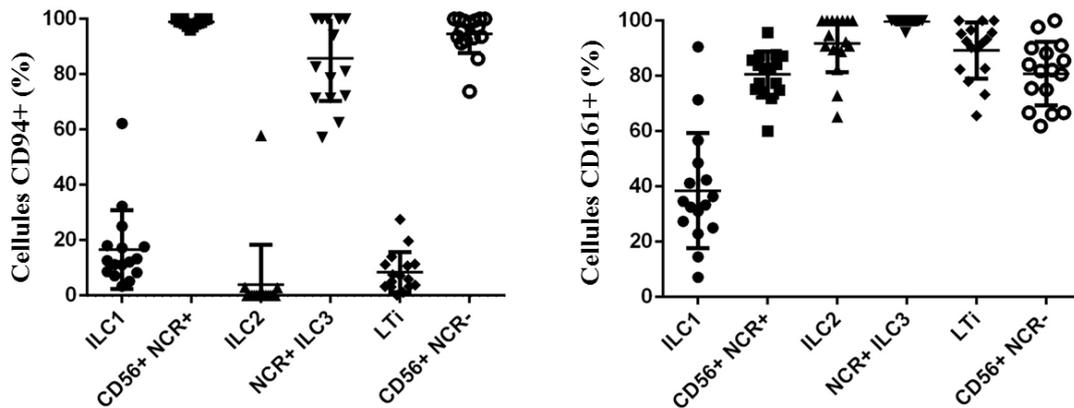


Figure 31. Détermination de l'expression de CD94 et CD161 par les ILC.

Le niveau d'expression de CD94 et CD161 a été évalué à la surface des divers sous-types d'ILC (ILC1, ILC CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTi et ILC CD56⁺ NCR⁻) issues de sang périphérique de donneurs sains par cytométrie de flux. Donneurs sains: n=16, âge 20-68, 2 hommes et 2 femmes par classe d'âge (0-29, 30-44, 45-59, plus âgés que 59 ans). Chaque point correspond à la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon de donneur sain analysé; L'écart-type correspond aux barres verticales et la moyenne de tous les échantillons aux barres horizontales.

Nos résultats suggèrent l'inhibition de la fonction des ILC CD56⁺ NCR^{+/-} ainsi que des NCR⁺ ILC3, d'une part en contexte physiologique par les lymphocytes B et les cellules dendritiques et d'autre part lors de gliome, par les cellules tumorales LLT1⁺. La modulation de la fonction des ILC serait également être médiée par l'interaction de CD94 avec des complexes membranaires HLA-E-peptides, la molécule associée à CD94 à la surface des ILC conditionnant alors l'aspect activateur ou inhibiteur de la régulation fonctionnelle qui s'ensuit.

Les ILC semblent ainsi capables, selon leur sous-type, d'activer les lymphocytes T en leur présentant des antigènes peptidiques ainsi qu'en leur délivrant des signaux de co-stimulation. Cependant, l'échange entre les ILC et les cellules immunitaires pourrait être à double sens. En effet, des cellules effectrices telles que les lymphocytes B et les cellules dendritiques, mais aussi certaines cellules tumorales, paraissent aptes à réguler la fonction de sous-types d'ILC.

2.3.5 Les ILC : cibles des adjuvants des immunothérapies via leurs TLR ?

Les récepteurs de type Toll chez l'Homme constituent une famille de dix molécules (TLR1 à 10) interagissant chacune avec un ligand particulier. Les TLR reconnaissant des motifs moléculaires associés à des pathogènes ou à un danger grâce à leurs domaines de répétitions riches en leucine. Des agonistes des récepteurs TLR sont couramment utilisés en tant qu'adjuvants de la réponse immunitaire lors de protocoles de vaccination thérapeutique anti-tumorale. Par exemple, l'association d'un agoniste du TLR9, CpG-ODN, avec un peptide vaccinal et un adjuvant incomplet de Freund a permis l'induction d'une forte réponse lymphocytaire T chez des patients atteints de mélanome¹². L'injection intravaginale des agonistes du TLR3 CpG et poly-(I:C) stimule également la réponse lymphocytaire T CD8 et la régression des tumeurs génitales lors de combinaison avec une vaccination thérapeutique dirigée contre les oncogènes E6 et E7 des papillomavirus chez l'Homme¹⁵⁹. Enfin, l'administration d'un agoniste du TLR4 permet de pallier l'inefficacité de la chimiothérapie par doxorubicine lors de tumeurs déficientes en protéine B1 du groupe de haute mobilité (*High-mobility group box 1* : HMGB1)¹⁶⁰.

L'expression des récepteurs TLR par les ILC permettrait ainsi de mieux comprendre comment les cibler par des adjuvants d'immunothérapies. Nous avons donc analysé la distribution des TLR 1 à 10 dans les ILC par PCR. Les ILC ont, pour cela, été triées selon leur phénotype et leur ARN messager total extrait. L'ADN complémentaire de cet ARN messager a ensuite été synthétisé par RT-PCR puis amplifié. La qualité de l'ADN complémentaire obtenu a été évaluée par la réalisation de PCR pour des gènes domestiques tels que β -2 microglobuline et gapdh. Suite à cette vérification, l'ADN complémentaire a été incubé avec des amorces spécifiques de chaque TLR, et ce mélange a été soumis à une PCR. L'amplification de séquences de l'ADN complémentaire correspondant aux séquences des TLR a ensuite été déterminée grâce à la réalisation d'une électrophorèse qualitative. La présence d'une bande électrophorétique à la même distance migratoire que celle obtenue pour le contrôle positif signifie que le sous-type cellulaire auquel correspond l'ADN complémentaire analysé exprime bien, au niveau génétique, le TLR. L'échantillon est considéré ambigu lors d'intensité de bande inférieure à celle du contrôle positif. L'absence de

bande électrophorétique à la même distance migratoire que celle du contrôle positif démontre, enfin, que le sous-type d'ILC analysé n'exprime pas le TLR au niveau ARN messager.

L'ADNc isolé à partir de monocytes activés par du LPS constitue le contrôle positif de cette expérience. Les données obtenues démontrent une variabilité de l'expression des ADNc des TLR selon les sous-types de récepteurs et d'ILC (Tableau 5 ; Figure 32). Les TLR3 et 10 sont, en premier lieu, exprimés par toutes les ILC. Les ADNc des TLR4-8, en second lieu, sont présents dans toutes les ILC, exceptées les ILC1 qui, en parallèle, constituent le seul sous-type à exprimer TLR2. Finalement, les TLR9 et 1 sont exprimés par les ILC1, ILC2, NCR⁺ ILC3 ainsi que par les cellules CD56⁺ NCR⁺. Pour résumer, les données obtenues suggèrent que les ILC1 (TLR1-3⁺ TLR4-8⁻ TLR9-10⁺) se différencient des autres ILC (TLR1^{+/-} TLR2⁻ TLR3-8⁺ TLR9^{+/-} TLR10⁺) concernant l'expression des TLR au niveau de l'ADNc.

	ILC1	CD56+ NCR+	ILC2	NCR+ ILC3	LTi	CD56+ NCR-
TLR1	+	+	+	+	-	-
TLR2	+	-	-	-	-	-
TLR3	+	+	+	+	+	+
TLR4	-	+	+	(+)	(+)	(+)
TLR5	-	+	+	+	+	+
TLR6	-	+	+	+	(+)	(+)
TLR7	-	+	+	+	(+)	(+)
TLR8	-	+	+	+	(+)	+
TLR9	+	(+)	(+)	+	-	+
TLR10	+	+	+	+	+	+

Tableau 5. Expression de l'ADNc des TLR par les ILC de sang périphérique humain. Ces données ont été obtenues par amplification PCR de l'ADNc et électrophorèse.

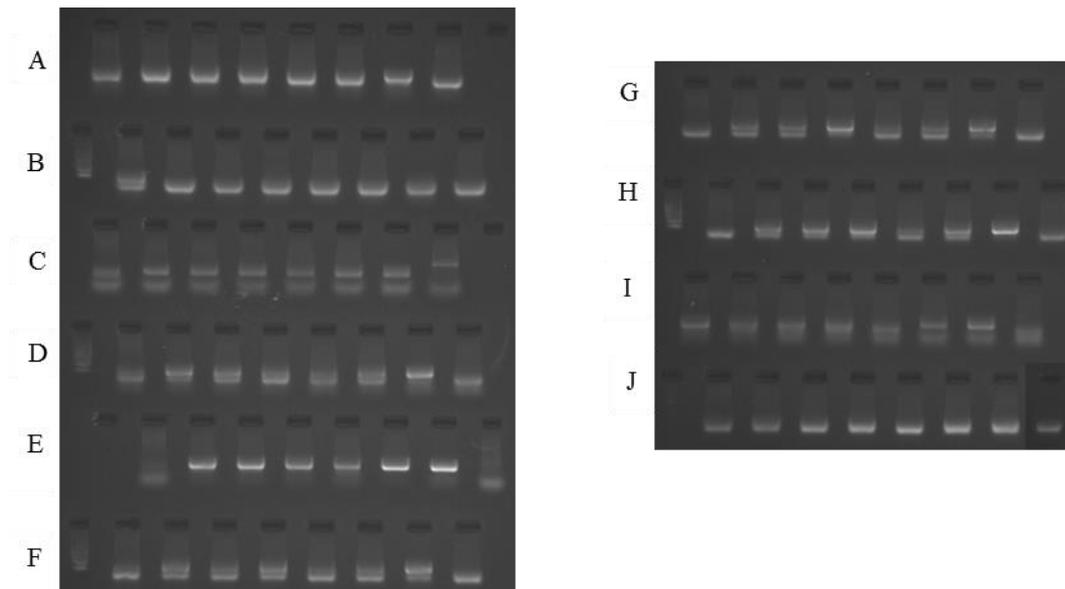


Figure 32. Expression génique des TLR1-10 par les ILC.

Après amplification par PCR et ajout d'un marqueur, l'ADNc des ILC a été chargé sur un gel d'agarose à 5%. Une électrophorèse à 120V durant 20-30 minutes s'en est suivi. Le contrôle négatif est l'ADNc de lymphocytes T CD8 (TLR1-19) ou de l'eau exempte de RNase (TLR10) et le contrôle positif l'ADNc de monocytes activés par du LPS. Ordre de chargement des échantillons de PCR: ILC1, CD56⁺ NCR⁺, ILC2, NCR⁺ ILC3, LTi, CD56⁺ NCR⁻, contrôle positif, contrôle négatif. A: TLR1, B: TLR2, C: TLR3, D: TLR4, E: TLR5, F: TLR6, G: TLR7, H: TLR8, I: TLR9, J: TLR10. B, D, F, H: le premier puits correspond au chargement d'un marqueur de poids de l'ADN Promega de 100 paires de base.

Cependant, ces résultats ont été collectés à partir des ILC d'un seul donneur sain et devraient être confirmés chez d'autres donneurs. De plus, l'expression génique des TLR n'est pas toujours suffisante pour l'induction d'une signalisation médiée par les TLR. CRELLIN et al. ont récemment démontré que certaines ILC expriment TLR2 mais que leur production d'IL-22 n'est induite que si elles sont stimulées par l'IL-2 ou l'IL-15 en association avec Pam3, un ligand des TLR1 et 2¹⁶¹. Ainsi, nos résultats permettent de proposer un modèle dans lequel la fonction des ILC serait influencée par les ligands des TLR utilisés en vaccination thérapeutique, mais des tests fonctionnels réalisés prochainement sont nécessaires afin de mieux comprendre ce phénomène.

CONCLUSION

Malgré les avancées dans ce domaine, la thérapeutique anti-tumorale doit enrichir ses stratégies afin d'améliorer son efficacité et ainsi d'augmenter le taux de guérison des patients. Une approche novatrice, l'immunothérapie, consiste en la stimulation du système immunitaire afin qu'il induise une lyse des cellules tumorales. Celle-ci fait intervenir divers mécanismes dont le transfert adoptif de cellules au patient. Les cellules concernées sont de différents types et l'efficacité de ce traitement dépend des cellules administrées mais aussi du type de cancer à traiter.

Les cellules lymphoïdes innées sont des effecteurs immuns récemment découverts. Les connaissances à leur sujet sont ainsi faibles et en cours d'investigation. Cependant, les résultats déjà parus sont très prometteurs et ont conduit l'élaboration de ce projet destiné à mieux comprendre leurs fonctions grâce à leur identification et phénotypage.

La proportion des ILC et, surtout, des ILC1 et des cellules $CD56^+ NCR^-$ est, en premier lieu, soumise à variation lors de l'apparition de cancer, soulevant de nombreuses hypothèses telles que la migration de ces effecteurs vers le site tumoral. En effet, les ILC semblent aptes à migrer grâce à la voie des chimiokines et à des molécules d'adhésion vers diverses localisations dépendantes du sous-type cellulaire et, très probablement, vers des sites tumoraux. L'étude de leur fréquence dans le micro-environnement tumoral chez l'Homme mais aussi en contexte murin normal ou lors d'inhibition de la sécrétion tumorale de chimiokines, permettraient d'aider à la confirmation de cette théorie.

Les ILC recrutées de cette manière par la tumeur pourraient induire une lyse des cellules tumorales *via* les voies de signalisation impliquant CD27, TIM-3, CD155 et TRAIL. Mais d'autres mécanismes de régulation et d'apoptose mis en place par les cellules tumorales et médiés par Siglec-7 et la voie Fas/FasL pourraient, au contraire, empêcher les ILC d'exercer leur action immunostimulatrice. Les données ici présentées convergent également pour suggérer un rôle des ILC dans l'immunosuppression médiée par le micro-environnement tumoral *via* la dégradation de l'ATP en adénosine.

Enfin, un atout des ILC est leur probable activation des lymphocytes T par la présentation d'antigènes, la délivrance de signaux de co-stimulation et la production de

cytokines effectrices. La comparaison de l'expression des molécules de CMHII sur les ILC issues de divers organes et sites tumoraux serait intéressante à effectuer, étant donné que, d'après les résultats publiés, l'expression de CMHII sur les ILC semble dépendante de leur localisation. Ces cellules pourraient par conséquent stimuler les effecteurs du système immunitaire. Mais cette communication pourrait être à double sens, étant donné les données phénotypiques suggérant leur régulation par les lymphocytes B et les cellules dendritiques voire par des cellules tumorales exprimant la molécule LLT1, *i.e* lors de certains cancers. L'évaluation de la présence de molécules de la famille NKG2 à la surface des ILC permettrait, enfin, de confirmer leur aptitude à reconnaître des complexes HLA-peptides.

Les ILC semblent ainsi posséder de nombreux atouts pour l'utilisation en immunothérapie adoptive anti-tumorale. Les divers mécanismes ici détaillés concernant l'inhibition de leur fonction par les cellules tumorales pourraient être ciblés lors de leur manipulation *ex vivo* avant administration. Ainsi, bloquer leur enzyme CD73 et leur marquer FasL pourrait, par exemple, constituer des pistes d'amélioration de leur efficacité anti-tumorale.

Enfin, considérant leur expression génétique en TLR, les ILC pourraient être ciblées lors de protocoles d'immunothérapie anti-tumorale utilisant des agonistes de ces récepteurs en tant qu'adjuvants. Des tests fonctionnels de signalisation devraient bientôt être conduits afin de confirmer cette hypothèse.

En conclusion, les ILC sont des cellules immunitaires relativement rares et récemment découvertes qui semblent être impliquées dans de nombreux processus physiologiques. Cependant, leurs rôles dans l'oncogénèse restent peu étudiés chez la souris et pas du tout chez l'Homme. Grâce à cette étude, nous avons ainsi démontré une possible implication des ILC dans l'immunité contre les tumeurs solides. L'affectation de la croissance, de la survie et du potentiel métastatique de la tumeur par les ILC doit cependant être encore recherchée. Leur communication avec les cellules tumorales ou stromales ainsi que leur capacité d'activation des lymphocytes T et leur signalisation par les TLR sont autant de points qui doivent encore être approfondis afin de pouvoir envisager l'utilisation des ILC dans le transfert adoptif anti-tumoral chez l'Homme.

Annexe

Extensive Phenotype Characterization of Innate Lymphoid Cells In Healthy Humans



B. Salomé¹, S. TrabANELLI¹, K. Michaud², P. Mangin², P. Romero¹, C. Jandus¹

¹Ludwig Center for Cancer Research, University of Lausanne, Switzerland
²Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, University Hospital (CHUV), Switzerland



INTRODUCTION / AIMS

Innate Lymphoid Cells (ILCs) are a recently identified cell family, which plays an important role in effector immune responses. Yet, ILCs remain poorly characterized in human donors. Therefore, we quantified in this work ILCs percentage and subset distribution in healthy donors peripheral blood or tissue. We correlated the observed results with age and sex. Finally, ILCs expression of cytokine/chemokine receptors, antigen presentation markers, CD69 and CD161 was assessed in peripheral blood.

1. Strategy of identification of ILCs

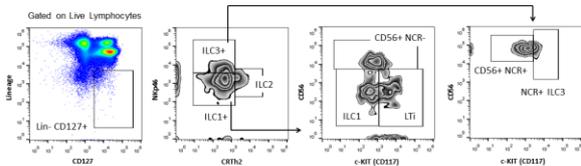


Figure 1. Strategy of identification of ILC subsets. Lineage (Lin-) antibodies cocktail: anti-CD3, -CD4, -CD14, -CD15, -CD16, -CD19, -CD20, -CD33, -CD34, -CD203c, -FcγRIg. ILCs are defined as Lin- CD127+ cells; ILC subsets are then identified thanks to their Nkp46, CRTH2, c-KIT and CD56 expression.

2. Healthy human peripheral blood ILCs decrease with age

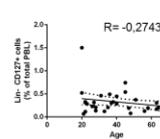


Figure 2. Correlation between age and ILCs percentages in healthy donors peripheral blood. Flow cytometry was performed to determine total ILCs (Lin- CD127+) percentages in peripheral blood of 41 healthy donors. Correlation non significant at 95% confidence interval.

ILCs percentages are however not significantly different between men and women ($p=0.2903$, $N=32$ (1:1 sex ratio)).

3. ILC subsets distribution in healthy human varies depending on their localization

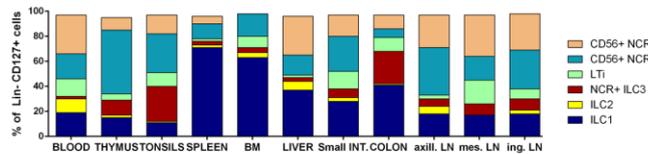


Figure 3. ILC subsets distribution in healthy human organs. Flow cytometry was performed on 32 healthy donors peripheral blood (1:1 sex ratio: 8x[<30], 8x[30-44], 8x[45-59], 8x[>60 years old]) and several organs from a cadaveric donor in order to determine the distribution of ILC subsets within all these organs. « BM » Bone Marrow, « Small Int. » Small Intestine, « Axill./Mes./Ing. LN » Axillar/Mesenteric/Inguinal Lymph Node.

4. ILCs express chemokine/cytokine receptors, antigen presentation molecules, activation markers and NK receptors in a subset-dependent manner

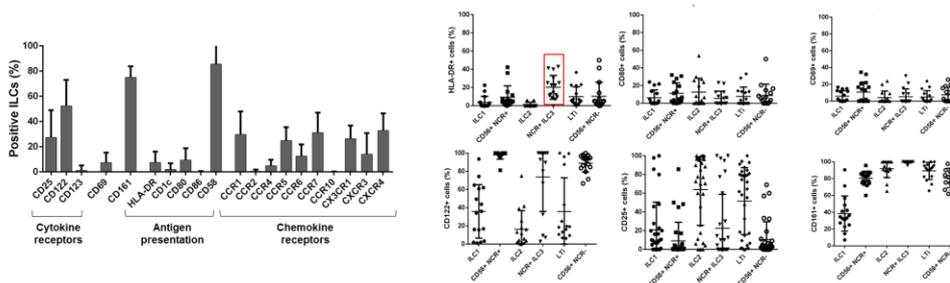


Figure 4. ILCs phenotype in healthy human peripheral blood. Phenotype of total resting ILCs (A) and their subsets (B) was analysed by flow cytometry in healthy human peripheral blood. CD25: N=32; other markers: N=16. Black vertical bars: standard deviation; horizontal bars: mean.

DISCUSSION

- Obtained results:**
- (1) ILCs are present in all analyzed human organs but decrease with age in peripheral blood;
 - (2) ILC subsets distribution depends on their location;
 - (3) ILCs express a broad range of cytokine/chemokine receptors, NK receptors, activation markers and antigen presentation molecules in a subset-dependent manner

Fundings: ProFemmes UNIL / Novartis / San Salvatore Foundations

Contact: berengere.salome@unil.ch

Bibliographie

¹FERLAY, J. et al., Cancer incidence and mortality patterns in Europe : Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*. 2013, vol.49, n°6, pp1374-1403.

²EU CLINICAL TRIALS REGISTER. Clinical trials for (cancer AND (Immunotherapy OR vaccine)). [en ligne]. Disponible sur : <<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=%28cancer+AND+%28Immunotherapy+OR+vaccine%29%29>>, (consulté le 18.08.2014).

³DUNN, GP. et al., Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. 2002, vol.3, n°11, pp991-998.

⁴CANCER IMMUNITY. TANTIGEN : Classification of tumor antigens. [en ligne]. Disponible sur : <<http://cvc.dfc.harvard.edu/tadb/HTML/classification.html>> (consulté le 08.10.2014).

⁵HANAHAN, D., WEINBERG, R.A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011, vol.144, n°5, pp646-674.

⁶EGEBLAD, M., RASCH, M.G., WEAVER, V.M., Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current opinion in Cell Biology*. 2010, vol.22, n°5, pp697-706.

⁷BAITSCH, L. et al., Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *Plos one*. 2012, vol.7, n°2, e30852.

⁸AHMED, M.M. et al., Harnessing the potential of radiation-induced immune modulation for cancer therapy. *Cancer Immunology Research*. 2013, vol.1, n°5, pp280-284.

⁹APETOH, L. et al., Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine*. 2007, vol.13, n°9, pp1050-1059.

¹⁰PAGE, D.B. et al., Immune modulation in cancer with antibodies. *Annual Review of Medicine*. 2013, vol.65, pp185-202.

¹¹KLAPPER, J.A. et al., High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. *Cancer*. 2008, vol.113, n°2, pp293-301.

¹²SPEISER, D.E. et al., Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, vol.115, n°3, pp739-746.

¹³SEREMET, T. et al., Tumor-specific antigens and immunologic adjuvants in cancer immunotherapy. *Cancer Journal*. 2011, vol.17, n°5, pp325-330.

¹⁴THOMPSON, J.A. et al., A phase I trial of CD3/CD28-activated T cells (Xcellerated T cells) and interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2003, vol.9, n°10, pp3562-3570.

¹⁵BESSER et al., Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clinical Cancer Research*. 2010, vol.16, n°9, pp2646-2655.

¹⁶PENG, W. et al., Transduction of tumor-specific T cells with CXCR2 chemokine receptor improves migration to tumor and antitumor immune responses. *Clinical Cancer Research*. 2010, vol.16, n°22, pp5458-5468.

¹⁷ROBBINS, P.F. et al., Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of Clinical Oncology*. 2011, vol.29, n°7, pp917-924.

¹⁸PARKHURST, M.R. et al., T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Molecular Therapy*. 2011, vol.19, n°3, pp620-626.

¹⁹STÄRCK, L. et al., Immunotherapy with TCR-redirectioned T cells: comparison of TCR-transduced and TCR-engineered hematopoietic stem cell-derived T cells. *Journal of Immunology*. 2014, vol.192, n°1, pp206-213.

²⁰KOCHENDERFER, J.N., ROSENBERG, S.A., Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature Reviews in Clinical Oncology*. 2013, vol.10, n°5, pp267-276.

²¹JUNE, C.H. et al., Engineered T cells for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2014, vol.63, n°9, pp969-975.

²²PULE, M.A. et al., Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nature Medicine*. 2008, vol.14, n°11, pp1264-1270.

²³SONG, D-G. et al., In vivo persistence, tumor localization and anti-tumor activity of CAR engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB). *Cancer Research*. 2011, vol.71, n°13, pp4617-4627.

²⁴KANDALAFI, L.E. et al., A phase I clinical trial of adoptive transfer of folate receptor-alpha redirected autologous T cells for recurrent ovarian cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2012, vol.10, n°157.

²⁵KOBAYASHI, H. et al., Phase I/II study of adoptive transfer of $\gamma\delta$ T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2011, vol.60, n°8, pp1075-1084.

²⁶ABE, Y. et al., Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated V γ 9 δ 2 T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Experimental Hematology*. 2009, vol.37, n°8, pp956-968.

²⁷NAKAJIMA, J. et al., A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous $\gamma\delta$ T cells. *European Journal of Cardiothoracic surgery*. 2010, vol.37, n°5, pp1191-1197.

²⁸ZHOU, J. et al., Anti- $\gamma\delta$ TCR antibody-expanded $\gamma\delta$ T cells: a better choice for the adoptive immunotherapy of lymphoid malignancies. *Cellular and Molecular Immunology*. 2012, vol.9, n°1, pp34-44.

²⁹BENNOUNA, J. et al., Phase-I study of Innacell $\gamma\delta$ 2, an autologous cell-therapy product highly enriched in $\gamma\delta$ 2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2008, vol.57, n°11, pp1599-1609.

³⁰NICOL, A.J. et al., Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *British Journal of Cancer*. 2011, vol.105, n°6, pp778-786.

³¹WILHELM, M. et al., Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical $\gamma\delta$ T cells. *Journal of Translational Medicine*. 2014, vol.12, n°45.

³²DENIGER, D.C. et al., Bispecific T-cells expressing polyclonal repertoire of endogenous $\gamma\delta$ T-cell receptors and introduced CD19-specific chimeric antigen receptor. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013, vol.21, n°3, pp638-647.

³³MOTOHASHI, S. et al., A phase I study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006, vol.12, n°20, pp6079-6086.

³⁴KUNII, N. et al., Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Science*. 2009, vol.100, n°6, pp1092-1098.

³⁵FUJII, S. et al., NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Frontiers in Immunology*. 2013, vol.4, n°409.

³⁶HECZEY, A. et al., Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy. *Blood*. 2014. Disponible à : <http://www.bloodjournal.org/content/early/2014/07/21/blood-2013-11-541235.long?sso-checked=true> (Consulté le 10.10.2014).

³⁷KIM, S. et al., Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005, vol.436, n°7051, pp709-713.

³⁸PARKHURST, M.R. et al., Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clinical Cancer Research*. 2011, vol.17, n°19, pp6287-6297.

³⁹GELLER, M.A. et al., A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy*. 2011, vol.13, n°1, pp98-107.

⁴⁰RUBNITZ, J.E. et al., NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2010, vol.28, n°6, pp955-959.

⁴¹CURTI, A. et al., Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2011, vol.118, n°12, pp3273-3279.

⁴²ILIOPOULOU, E.G. et al., A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2010, vol.59, n°12, pp1781-1789.

⁴³ARAI, S. et al., Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*. 2008, vol.10, n°6, pp625-632.

⁴⁴CUI, F. et al., Immune responsiveness in a mouse model of combined adoptive immunotherapy with NK and dendritic cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2013, vol.9, Suppl., n°7, pp162-168.

⁴⁵ZHANG, G. et al., Adoptive immunotherapy for non-small cell lung cancer by NK and cytotoxic T lymphocytes mixed effector cells: retrospective clinical observation. *International Immunopharmacology*. 2014, vol.21, n°2, pp396-405.

⁴⁶SALAGIANNI, M. et al., NK cell adoptive transfer combined with Ontak-mediated regulatory T cell elimination induces effective adaptive antitumor immune responses. *Journal of Immunology*. 2011, vol.186, n°6, pp3327-3335.

⁴⁷CHU, J. et al., CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia*. 2014, vol.28, n°4, pp917-927.

⁴⁸BESSER, M.J. et al., Development of allogeneic NK cell adoptive transfer therapy in metastatic melanoma patients: in vitro preclinical optimization studies. *PloS One*. 2013, vol.8, n°3.

⁴⁹TEL, J. et al., Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Research*. 2013, vol.73, n°3, pp1063-1075.

⁵⁰ROMANO, E. et al., Peptide-loaded Langerhans cells, despite increased IL15 secretion and T-cell activation in vitro, elicit antitumor T-cell responses comparable to peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells in vivo. *Clinical Cancer Research*. 2011, vol.17, n°7, pp1984-1997.

⁵¹OKADA, H. et al., Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with α -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology*. 2011, vol.29, n°3, pp330-336.

⁵²YAMANAKA, R. et al., Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clinical Cancer Research*. 2005, vol.11, n°11, pp4160-4167.

⁵³LIU, J. et al., Concurrent dendritic cell vaccine and strontium-89 radiation therapy in the management of multiple bone metastases. *Irish Journal of Medical Science*. 2014. Disponible en ligne: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11845-014-1145-9> (consulté le 05.09.2014).

⁵⁴AARNTZEN, E.H. et al., Targeting of ¹¹¹In-labeled dendritic cell human vaccines improved by reducing number of cells. *Clinical Cancer Research*. 2013, vol.19, n°6, pp1525-1533.

⁵⁵TIMMERMAN, J.M., Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*. 2012, vol.99, n°5, pp1517-1526.

⁵⁶NAIR, S.K., Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Annals of Surgery*. 2002, vol.235, n°4, pp540-549.

⁵⁷SCHADENDORF, D. et al., Dose-intensified bi-weekly temozolomide in patients with asymptomatic brain metastases from malignant melanoma: a phase II DeCOG/ADO study. *Annals of Oncology*. 2006, vol.17, n°10, pp1592-1597.

⁵⁸RIBAS, A. et al., Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2009, vol.15; n°19, pp6267-6276.

⁵⁹TRIOZZI, P.L. et al., Intratumoral injection of dendritic cells derived in vitro in patients with metastatic cancer. *Cancer*. 2000, vol.89, n°12, pp2646-2654.

⁶⁰POSCHKE, I. et al., A phase I clinical trial combining dendritic cell vaccination with adoptive T cell transfer in patients with stage IV melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2014, vol.63, n°10, pp1061-1071.

⁶¹VAN NUFFEL, A.M. et al., Intravenous and intradermal TriMix-dendritic cell therapy results in a broad T-cell response and durable tumor response in a chemorefractory stage IV-M1c melanoma patient. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2012. Vol.61, n°7, pp1033-1043.

⁶²ITALIANI, P., BORASCHI, D., From monocytes to M1/M2 macrophages : phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*. 2014, vol.5, pp514

⁶³HENNEMAN, B. et al., Phase I trial of adoptive immunotherapy of cancer patients using monocyte-derived macrophages activated with interferon gamma and lipopolysaccharide. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 1998, vol.45, n°5, pp250-256.

⁶⁴ANDREESEN, R. et al., Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages: rationale, current status, and perspectives. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998, vol.64, n°4, pp419-426.

⁶⁵PAGES, F. et al., Local immunostimulation induced by intravesical administration of autologous interferon-gamma-activated macrophages in patients with superficial bladder cancer. *Clinical Experimental Immunology*. 2002, vol.127, n°2, pp303-309.

⁶⁶LI, Q. et al., In vivo sensitized and in vitro activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy. *Journal of Immunology*. 2009, vol.183, n°5, pp3195-3203.

⁶⁷LI, Q. et al., Adoptive Transfer of Tumor Reactive B Cells Confers Host T-Cell Immunity and Tumor Regression. *Clinical Cancer Research*. 2011, vol.17, n°15, pp4987-4995.

⁶⁸Moutai, T. et al., A novel and effective cancer immunotherapy mouse model using antigen-specific B cells selected in vitro. *Plos one*. 2014, vol.9, n°3, e92732.

⁶⁹LI, X. et al., Immunotherapy of tumor with vaccine based on basic fibroblast growth factor-activated fibroblasts. *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology*. 2014, vol.140, n°2, pp271-280.

⁷⁰SPITS, H. et al., Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews in Immunology*. 2013, vol.13, n°2, pp145-149.

⁷¹FUCHS, A. et al., Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN-g-Producing Cells. *Immunity*. 2013, vol.38, n°4, pp769-781.

⁷²BERNINK, J.H. et al., Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nature Immunology*. 2013, vol.14, n°3, pp221-229.

⁷³BARLOW, J.L. et al., Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012, vol.129, n°1, pp191-198.

⁷⁴VAN DE PAVERT, S.A. et al., New insights into the development of lymphoid tissues. *Nature reviews in Immunology*. 2010, vol.10, n°9, pp664-674.

⁷⁵CONSTANTINIDES, M.G. et al., A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature*. 2014, vol.508, n°7496, pp397-401.

⁷⁶KLOSE, C.S. et al., Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell*. 2014, vol.157, n°2, pp340-356.

⁷⁷HUGHES, T. et al., The Transcription Factor AHR Prevents the Differentiation of a Stage 3 Innate Lymphoid Cell Subset to Natural Killer Cells. *Cell Reports*. 2014, vol.8, n°1, pp150-162.

⁷⁸VORNARBOURG, C. et al., Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t(+) innate lymphocytes. *Immunity*. 2010, vol.33, n°5, pp736-751.

⁷⁹VACCA, P. et al., Identification of diverse innate lymphoid cells in human decidua. *Mucosal Immunology*. 2014. Disponible à : <http://www.nature.com/mi/journal/vaop/ncurrent/full/mi201463a.html> (Consulté le 10.10.2014).

⁸⁰TEUNISSEN, M.B. et al., Composition of Innate Lymphoid Cell Subsets in the Human Skin: Enrichment of NCR(+) ILC3 in Lesional Skin and Blood of Psoriasis Patients. *Journal of Investigative dermatology*. 2014, vol.134, n°9, pp2351-2360.

⁸¹KIM, T.J. et al., Innate lymphoid cells facilitate NK cell development through a lymphotoxin-mediated stromal microenvironment. *Journal of Experimental Medicine*. 2014, vol.211, n°7, pp1421-1431.

⁸²SPENCER, S.P. et al., Adaptation of innate lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity. *Science*. 2014, vol.343, n°6169, pp432-437.

⁸³CHANG, J.H. et al., The chronicity of tonsillitis is significantly correlated with an increase in an LT α i cell portion. *Inflammation*. 2014, vol.37, n°1, pp132-141.

⁸⁴BERNINK, J.H. et al., Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nature Immunology*. 2013, vol.14, n°3, pp221-229.

⁸⁵SALIMI, M. et al., A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *Journal of Experimental Medicine*. 2013, vol.210, n°13, pp2939-2950.

⁸⁶DYRING-ANDERSEN, B. et al., Increased number and frequency of group 3 innate lymphoid cells in nonlesional psoriatic skin. *British Journal of Dermatology*. 2014, vol.170, n°3, pp609-616.

⁸⁷SHIELDS, J.D. et al., Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*. 2010, vol.328, n°5979, pp749-752.

⁸⁸KIRCHBERGER, S. et al., Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *Journal of Experimental Medicine*. 2013, vol.210, n°5, pp917-931.

⁸⁹MUNNEKE, J.M. et al., Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease. *Blood*. 2014, vol.124, n°5, pp812-821.

⁹⁰FUCHS, A. et al., Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells. *Immunity*. 2013, vol.38, n°4, pp769-781.

⁹¹YASUDA, K. et al., Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012, vol.109, n°9, pp3451-3456.

⁹²IMAI, Y. et al., Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, vol.110, n°34, pp13921-13926.

⁹³VAN DYKEN, S.J. et al., Chitin activates parallel immune modules that direct distinct inflammatory responses via innate lymphoid type 2 and $\gamma\delta$ T cells. *Immunity*. 2014, vol.40, n°3, pp414-424.

⁹⁴JOVANOVIC, I.P. et al., Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *International Journal of Cancer*. 2014, vol.137, n°7, pp1669-1682.

⁹⁵IKUTANI et al., Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity. *Journal of immunology*. 2012, vol.188, n°2, pp703-713.

⁹⁶OLIPHANT, C.J. et al., MHCII-Mediated Dialog between Group 2 Innate Lymphoid Cells and CD4(+) T Cells Potentiates Type 2 Immunity and Promotes Parasitic Helminth Expulsion. *Immunity*. 2014, vol.41, n°2, pp283-895.

⁹⁷MIRCHANDANI, A.S. et al., Type 2 innate lymphoid cells drive CD4+ Th2 cell responses. *Journal of Immunology*. 2014, vol.192, n°5, pp2442-2448.

⁹⁸LANE, P. et al., Lymphoid tissue inducer cells in adaptive CD4 T cell dependent responses. *Seminars in Immunology*. 2008, vol.20, n°3, pp159-163.

⁹⁹MAGRI, G. et al., Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nature Immunology*. 2014, vol.15, n°4, pp354-364.

¹⁰⁰FUKUOKA, A. et al., Identification of a novel type 2 innate immunocyte with the ability to enhance IgE production. *International Immunology*. 2013, vol.25, n°6, pp373-382.

¹⁰¹SCANDELLA, E. et al., Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nature Immunology*. 2008, vol.9, n°6, pp667-675.

¹⁰²KIMURA, K. et al., Dysregulated balance of retinoid-related orphan receptor γ t-dependent innate lymphoid cells is involved in the pathogenesis of chronic DSS-induced colitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012, vol.427, n°4, pp694-700.

¹⁰³EISENRING, M. et al., IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. *Nature Immunology*. 2010, vol.11, n°11, pp1030-1038.

¹⁰⁴RUFER, N., REICHENBACH, P., ROMERO, P., Methods for the ex vivo characterization of human CD8+ T subsets based on gene expression and replicative history analysis. *Adoptive Immunotherapy: Methods in Molecular Medicine*. 2005, vol.109, pp265-283.

¹⁰⁵TURNER, M.D. et al., Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica acta*. 2014, vol.1843, n°11, pp2563-2582.

¹⁰⁶CHAVEY, C. et al., Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Research*. 2007, vol.9, n°1, R15.

¹⁰⁷TSANG, J.Y. et al., CX3CL1 expression is associated with poor outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2013, vol.140, n°3, pp495-504.

¹⁰⁸LUAN, J. et al., Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997, vol.62, n°5, pp588-597.

¹⁰⁹FRICK, V.O. et al., CCR6/CCL20 Chemokine Expression Profile in Distinct Colorectal Malignancies. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2013, vol.78, n°3, pp298-305.

¹¹⁰SCHWARZE, S.R. et al., Modulation of CXCL14 (BRAX) expression in prostate cancer. *Prostate*. 2005, vol.64, n°1, pp67-74.

¹¹¹YATSUNAMI, J. et al., Interleukin-8 participates in angiogenesis in non-small cell, but not small cell carcinoma of the lung. *Cancer Letter*. 1997, vol.120, n°1, pp101-108.

¹¹²KRYCZEK, I. et al., Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *American Journal of Physiology, cell physiology*. 2007, vol.292, n°3, pp987-995.

¹¹³NAOR, D. et al., CD44 in cancer. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2002, vol.39, n°6, pp527-579.

¹¹⁴BORSIG, L. et al., Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, vol.99, n°4, pp2193-2198.

¹¹⁵BORST, J., HENDRIKS, J., XIAO, Y., CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Current Opinion in Immunology*. 2005, vol.17, n°3, pp275-281.

¹¹⁶JILAVEANU, L.B. et al., CD70 expression patterns in renal cell carcinoma. *Human Pathology*. 2012, vol.43, n°9, pp1394-1399.

¹¹⁷HISHIMA, T. et al., CD70 Expression in Thymic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2000, vol.24, n°5, pp742-746.

¹¹⁸SCHÜRCH, C. et al., CD27 signaling on chronic myelogenous leukemia stem cells activates Wnt target genes and promotes disease progression. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012, vol.122, n°2, pp624-638.

¹¹⁹VASKOVA, M. et al., CD44 and CD27 delineate B-precursor stages with different recombination status and with an uneven distribution in nonmalignant and malignant hematopoiesis. *Tissue Antigens*. 2008, vol.71, n°1, pp57-66.

¹²⁰KELLY, J.M. et al., Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nature Immunology*. 2012, vol.3, n°1, pp83-90.

¹²¹ROBERTS, D.J. et al., Control of established melanoma by CD27 stimulation is associated with enhanced effector function and persistence, and reduced PD-1 expression of tumor infiltrating CD8(+) T cells. *Journal of Immunotherapy*. 2010, vol.33, n°8, pp769-779.

¹²²GLEASON, M.K. et al., Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*. 2012, vol.119, n°13, pp3064-3072.

¹²³KAGESHITA, T. et al., Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *International Journal of Cancer*. 2002, vol.99, n°6, pp809-816.

¹²⁴LAHM, H. et al., Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2001, vol.127, n°6, pp375-386.

¹²⁵KATOH, S. et al., Involvement of Galectin-9 in Lung Eosinophilia in Patients with Eosinophilic Pneumonia. *International archives of allergy and immunology*. 2010, vol.153, n°3, pp294-302.

¹²⁶NAGAHARA, K. et al., Galectin-9 Increases Tim-3+ Dendritic Cells and CD8+ T Cells and Enhances Antitumor Immunity via Galectin-9-Tim-3 Interactions. *Journal of Immunology*. 2008, vol.181, n°11, pp7660-7669.

¹²⁷MONNEY, L. et al., Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002, vol.415, n°6871, pp536-541.

¹²⁸FUCHS, A. et al., Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *Journal of Immunology*. 2004, vol.172, n°7, pp3994-3998.

¹²⁹CHAN, C.J. et al., The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nature Immunology*. Vol.15, n°5, pp431-438.

¹³⁰MASSON, D. et al., Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut*. 2001, vol.49, n°2, pp236-240.

¹³¹GROMEIER, M. et al., Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, vol.97, n°12, pp6803-6808.

¹³²SLOAN, K.E. et al., CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer*. 2004, vol.4, n°73.

¹³³NAKAI, R. et al., Overexpression of Necl-5 correlates with unfavourable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Science*. 2010, vol.101, n°5, pp1326-1330.

¹³⁴JANDUS, C. et al., Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. *Journal of clinical investigation*. 2014, vol.124, n°4, pp1810-1820.

¹³⁵HAHNE, M. et al., Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*. 1996, vol.274, n°5291, pp1363-1366.

¹³⁶ANDREOLA, G. et al., Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *Journal of Experimental Medicine*. 2002, vol.195, n°10, pp1303-1316.

¹³⁷MOTZ, G.T. et al., Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nature Medicine*. 2014, vol.20, n°6, pp607-615.

¹³⁸TAKEDA, K. et al., Targeting death-inducing receptors in cancer therapy. *Oncogene*. 2007, vol.26, n°25, pp3745-3757.

¹³⁹LI, Y. et al., Expression of TRAIL, DR4, and DR5 in bladder cancer: correlation with response to adjuvant therapy and implications of prognosis. *Urology*. 2012, vol.79, n°4, pp968.e7-e15.

¹⁴⁰SPIEIRINGS, D.C. et al., Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clinical Cancer Research*. 2003, vol.9, n°9, pp3397-3405.

¹⁴¹STRATER, J. et al., Expression of TRAIL and TRAIL receptors in colon carcinoma: TRAIL-R1 is an independent prognostic parameter. *Clinical Cancer Research*. 2002, vol.8, n°12, pp3734-3740.

¹⁴²DO, M.T. et al., Ilimaquinone induces death receptor expression and sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through activation of ROS-ERK/p38 MAPK-CHOP signaling pathways. *Food and Chemical Toxicology*. 2014, vol.71, pp51-59.

¹⁴³TAKEDA, K. et al., Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*. 2001, vol.7, n°1, pp94-100.

¹⁴⁴BEAVIS, P.A. et al., CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology*. 2012, vol.33, n°5, pp231-237.

¹⁴⁵DWYER, K.M. et al., CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic signaling*. 2007, vol.3, n°1-2, pp171-180.

¹⁴⁶RYZHOV, S. et al., Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells. *Journal of Immunology*. 2011, vol.187, n°11, pp6120-6129.

¹⁴⁷CHALMIN, F. et al., Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity*. 2012, vol.36, n°3, pp362-373.

¹⁴⁸DEAGLIO, S. et al., Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Journal of Experimental Medicine*. 2007, vol.204, n°6, pp1257-1265.

¹⁴⁹MORI, L., DE LIBERO, G., T cells specific for lipid antigens. *Immunologic research*. 2012, vol.53, n°1-3, pp191-199.

¹⁵⁰KJER-NIELSEN, L. et al., MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012, vol.491, n°7426, pp717-723.

¹⁵¹DAVIS, S.J. et al., The nature of molecular recognition by T cells. *Nature immunology*. 2003, vol.4, n°3, pp217-224.

¹⁵²GREWAL, I.S., FLAVELL, R.A., A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunology Today*. 1996, vol.17, n°9, pp410-414.

¹⁵³FOY, T.M. et al., gp39-CD40 Interactions Are Essential for Germinal Center Formation and the Development of B Cell Memory. *Journal of Experimental Medicine*. 1994, vol.180, n°1, pp157-163.

¹⁵⁴SULLIVAN, L.C. et al., The Heterodimeric Assembly of the CD94-NKG2 Receptor Family and Implications for Human Leukocyte Antigen-E Recognition. *Immunity*. 2007, vol.27, n°6, pp900-911.

¹⁵⁵FANG, M. et al., CD94 is essential for NK cell-mediated resistance to a lethal viral disease. *Immunity*. 2011, vol.34, n°4, pp579-589.

¹⁵⁶ALDEMIR, H. et al., Cutting Edge: Lectin-Like Transcript 1 Is a Ligand for the CD161 Receptor. *Journal of Immunology*. 2005, vol.175, n°12, pp7791-7795.

¹⁵⁷ROSEN, D.B. et al., Functional Consequences of Interactions between Human NKR-P1A and Its Ligand LLT1 Expressed on Activated Dendritic Cells and B Cells. *Journal of Immunology*. 2008, vol.180, n°10, pp6508-6517.

¹⁵⁸ROTH, P. et al., Malignant Glioma Cells Counteract Antitumor Immune Responses through Expression of Lectin-Like Transcript-1. *Cancer research*. 2007, vol.67, n°8, pp3540-3544.

¹⁵⁹DOMINGOS-PEREIRA, S. et al., Intravaginal TLR agonists increase local vaccine-specific CD8 T cells and human papillomavirus-associated genital-tumor regression in mice. *Mucosal Immunology*. 2013, vol.6, n°2, pp393-404.

¹⁶⁰YAMAZAKI, T. et al., Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists. *Cell death and differentiation*. 2014, vol.21, n°1, pp69-78.

¹⁶¹CRELLIN, N.K. et al., Regulation of Cytokine Secretion in Human CD127+ LTI-like Innate Lymphoid Cells by Toll-like Receptor 2. *Immunity*. 2010, vol.33, n°5, pp752-764.

Nom - Prénoms : SALOMÉ Bérengère Marie

Titre de la thèse : IMMUNITÉ INNÉE ANTI-TUMORALE : IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE NOUVEAUX ACTEURS CELLULAIRES A VISÉE THÉRAPEUTIQUE

Résumé de la thèse :

Face aux limites des stratégies thérapeutiques anti-tumorales de premières lignes, l'immunothérapie anti-tumorale est un domaine en plein essor qui nécessite encore d'être amélioré. L'une de ces approches consiste en le transfert de cellules immunitaires chez des patients atteints de cancer. Ce mémoire relate ainsi de la caractérisation phénotypique d'une famille de cellules immunes récemment découvertes, les cellules lymphoïdes innées (ILC). Le principal objectif de ce travail est la meilleure compréhension des possibles rôles des ILC au sein du système immunitaire et, en particulier, de leur implication dans l'oncogénèse ainsi que de leur potentielle utilisation en thérapie anti-cancéreuse.

MOTS CLÉS :

CELLULES LYMPHOIDES INNEES ; CANCER ; IMMUNOTHERAPIE ; ONCOGENESE ; IMMUNITE ; TRANSFERT ADOPTIF.

JURY

**PRÉSIDENT : Pr. Virginie FERRÉ, Doyen, PU-PH en virologie
Faculté de Pharmacie de Nantes / CHU de Nantes**

**ASSESEURS : Dr. Stéphane BIRKLE, MCU en Immunologie
Faculté de Pharmacie de Nantes / INSERM U892
Pr. Gilles BLANCHO, PU-PH, Directeur de l'ITUN
Faculté de Médecine de Nantes / CHU de Nantes**

Adresse de l'auteur : 14 boulevard Guist'hau, 44000 Nantes