

Université de Montréal

**Étude de l'expression de la molécule d'adhérence  
CD146 dans les lymphocytes T**

par  
Cécile Grange

Programme de Sciences Biomédicales  
Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté Université de Montréal  
en vue de l'obtention du grade de Doctorat  
en Sciences Biomédicales

avril 2014

© Cécile Grange, 2014

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

**Étude de l'expression de la molécule d'adhérence  
CD146 dans les lymphocytes T**

Présentée par:

**Cécile Grange**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

**Dr. Hassan Fahmi**, président-rapporteur

**Dr. Réjean Lapointe**, directeur de recherche

**Dr. Jean-François Cailhier**, co-directeur de recherche

**Dr. Etienne Gagnon**, membre du jury

**Dre. Chantale Bernatchez**, examinatrice externe

**Dr. Jean-François Gauchat**, représentant de la Doyenne

## Résumé

Les tumeurs solides sont infiltrées par des cellules immunes (TIIC) dont la nature, la fonction et la composition varient d'un patient à l'autre. Ces cellules inflammatoires influencent l'invasion tumorale en contrôlant la croissance et le potentiel métastatique d'une tumeur. Ainsi, il est proposé d'utiliser cette infiltration comme outil diagnostique et pronostic de routine.

Certaines cellules sont bien connues pour jouer un rôle important dans le contrôle de la progression tumorale, comme c'est le cas des lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> alors que d'autres possèdent un rôle contradictoire. Étant donné la dépendance des tumeurs sur l'équilibre entre ces différentes cellules, il est important d'identifier les fonctions précises des cellules immunes au sein de la tumeur. De nombreuses études sont réalisées afin d'identifier des marqueurs descriptifs du phénotype et la fonction des cellules immunes dans la tumeur.

Ce projet de doctorat se divise en deux parties : 1- Identifier la méthode de désagrégation des tissus tumoraux altérant le moins la biologie des TIIC pour leur caractérisation. 2- Caractériser l'expression de la molécule d'adhérence CD146 dans les TIIC et en identifier l'origine.

L'identification de marqueurs pour la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des TIIC a été réalisée, entre autres, par la détection de protéines exprimées par la cellule. Dans la première partie de ce projet, nous avons démontré que les méthodes utilisées pour désagréger les tissus tumoraux dans le but d'isoler les TIIC induisent des changements dans la biologie de ces cellules ce qui peut fausser les conclusions qui en dérivent. Nous avons donc comparé l'impact de trois méthodes de désagrégation : une dissociation mécanique utilisant la Médimachine<sup>TM</sup> et deux digestions enzymatiques utilisant une collagénase de type I seule ou combinée à de la collagénase de type IV et de la DNase I de type II. Nous nous sommes intéressés à l'effet de ces méthodes sur des paramètres tels que la viabilité cellulaire, l'altération des protéines de surface et la capacité des cellules à proliférer. Nous avons démontré que ces méthodes affectent la viabilité des cellules de manière comparable, alors que

la détection de certaines protéines de surface et la capacité de proliférer est réduite/inhibée par les traitements enzymatiques. Nous concluons qu'une méthode mécanique utilisant la Médimachine<sup>TM</sup> est mieux adaptée à la caractérisation des THIC afin de conserver leurs propriétés.

Dans la deuxième partie de notre projet, nous avons adapté cette méthode à la caractérisation des THIC. Nous avons porté une attention particulière à la molécule d'adhérence CD146 dont l'implication dans la migration des cellules immunes à travers l'endothélium vers les sites d'inflammation est de plus en plus étudiée dans les maladies auto-immunes. Nous avons mis en évidence une augmentation des proportions de cellules immunes exprimant CD146 dans les tumeurs comparativement au sang de patients de cancers. Cette expression est induite par les cellules tumorales tout en étant accrue par la nécrose de celles-ci. Nous démontrons que ces cellules sont majoritairement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> présentant un profil immunosuppresseur.

En conclusion, nos résultats suggèrent que CD146 participe à la mise en place du contexte immunitaire dans la tumeur et augmente la capacité de migration des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'induction par les cellules tumorales de cette molécule d'adhérence dans les cellules suppressives pourrait contribuer aux mécanismes immunorégulateurs mis en place par la tumeur. CD146 pourrait être un marqueur d'intérêt pour l'identification des cellules immunosuppressives et pour le développement de nouvelles thérapies.

**Mots-clés :** Cellules immunes infiltrant les tumeurs, désagrégation tumorale, CD146 (Melanoma cell adhesion molecule), cellules immunorégulatrices, Humain, cancer du rein, cancer du sein, cancer du poumon.

## Abstract

Solid tumors are infiltrated by immune cells (TIIC), which vary in function and proportion from patient to patient. These inflammatory cells may contribute positively or negatively to tumor invasion, by controlling the growth and the metastatic potential of tumors. It has therefore been proposed to use infiltration as a diagnostic and prognostic tool.

Certain cells play an important role in the control of tumor progression, as is the case of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, whereas others present an ill-defined role. Since the progression of tumors depends on the balance between these cell types, it is important to identify their specific functions within the tumor. Many studies have therefore focused on identifying markers, which are suggestive of phenotype and function of immune cells in the tumor.

This project is divided into two parts: 1 – The identification of a tumor tissue disaggregation method which induced minimal effects on TIIC biology. 2 – The characterization of the expression of the adhesion molecule CD146 in TIIC and understand its regulation.

Marker identification for phenotypic and functional characterization of TIIC is carried out by detection of cell proteins. In the first part of this project, we showed that methods used to disaggregate tumor tissue in order to isolate TIIC induce changes in cell biology, which may alter results. We thus compared the effects of three disaggregation methods: mechanical disruption using Medimachine<sup>TM</sup> and two enzymatic digestions using a type I collagenase alone or combined with type IV collagenase and type II DNase I, on parameters such as cell viability, cell surface marker detection and cell proliferation. We showed that these methods affect cell viability in a comparable manner, whereas the detection of certain surface proteins and proliferative capacity of cells was reduced by enzymatic treatments. We concluded that a mechanical method using Medimachine<sup>TM</sup> is more suitable for the characterization of TIIC.

In the second part of our project, we adapted this method to the characterization of TIIC. We focused on CD146, an adhesion molecule that was shown to be involved in immune

cell migration in autoimmune disease. We demonstrated an increase of CD146<sup>+</sup> immune cells in tumors compared to the blood of the same patients. This expression was shown to be induced by tumor cells and increased by necrosis. We showed that these cells are predominantly CD4<sup>+</sup> T lymphocytes with an immunosuppressive profile.

In conclusion, our results suggest that CD146 is involved in the establishment of the tumor immune environment and may increase the migratory capacity of CD4<sup>+</sup> T cells toward tumors. Tumor cell induction of this adhesion molecule by suppressor cells could contribute to the immunoregulatory mechanisms established by tumors. CD146 may be a useful marker for the identification of immunosuppressive cells and development of new therapies.

**Keywords :** Tumor infiltrating immune cells, tumor desaggregation, CD146 (melanoma cell adhesion molecule), immunoregulatory cells, Human, kidney tumors, breast tumors, lung tumors.

# Table des matières

## Pages liminaires

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xviii
<b>1<sup>ère</sup> Section : Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Objectif général et structure de la thèse.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Le Cancer.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Épidémiologie.....	2
1.1.2 Typologie des cancers.....	3
1.1.3 Le cancer du poumon.....	4
1.1.4 Le cancer du sein.....	5
1.1.5 Le cancer du rein.....	6
1.1.6 Le TNM.....	8
1.1.7 Transformation des cellules en cellules cancéreuses.....	8
1.1.7.1 Origine de la malignité des cellules.....	8
1.1.7.2 Types de transformations.....	9
1.1.7.3 Conséquences des perturbations génétiques dans la cellule.....	10
<i>Le potentiel de réplication illimité.....</i>	<i>10</i>
<i>L'autosuffisance en facteurs de croissance.....</i>	<i>10</i>
<i>L'insensibilité aux signaux antiprolifératifs.....</i>	<i>11</i>
<i>L'évasion à la mort cellulaire.....</i>	<i>11</i>
<i>L'induction de l'angiogenèse.....</i>	<i>11</i>
<i>Le potentiel métastatique et l'invasion tissulaire.....</i>	<i>12</i>
<i>La reprogrammation de leur métabolisme énergétique.....</i>	<i>12</i>
<i>L'induction de l'inflammation.....</i>	<i>12</i>
<i>L'évasion à la réponse immune antitumorale.....</i>	<i>12</i>

<b>1.2 Rôle du système immunitaire dans l'évolution des tumeurs</b> .....	<b>13</b>
1.2.1 L'évolution du concept d'immunosurveillance.....	14
1.2.2 Reconnaissance et élimination des cellules tumorales par le système immunitaire .....	14
1.2.3 L'équilibre.....	17
1.2.4 L'évasion des cellules cancéreuses au système immunitaire.....	19
1.2.4.1 Perte de la reconnaissance de la tumeur par cellules du système immunitaire. ....	19
1.2.4.2 Résistance aux signaux de mort.....	19
1.2.4.3 Induction de l'anergie des cellules T activées.....	20
<i>L'expression des CTLA-4 et PD-1</i> .....	20
<i>L'expression du facteur de croissance des tumeurs <math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>)</i> .....	20
<i>L'expression de PGE2</i> .....	20
<i>L'expression du VEGF</i> .....	21
<i>L'expression d'enzymes immunosuppressives</i> .....	21
1.2.4.4 Recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives.....	21
Les lymphocytes T régulateurs.....	21
1.2.5 L'infiltration immunitaire comme marqueur pronostic du développement tumoral.....	24
1.2.5.1 La nature de l'infiltration.....	24
1.2.5.2 La localisation de l'infiltration.....	27
1.2.5.3 La densité.....	28
1.2.5.4 Immunoscore.....	28
1.2.6 Méthodes de caractérisation des cellules immunitaires infiltrantes.....	29
1.2.6.1 L'immunohistochimie .....	30
1.2.6.2 L'immunofluorescence.....	30
1.2.6.3 La cytométrie de flux.....	31
1.2.6.4 L'analyse d'expression des gènes.....	31
1.2.7 L'immunothérapie des cancers: .....	32
1.2.7.1 L'immunothérapie à base de cytokines.....	32
1.2.7.2 L'immunothérapie utilisant des anticorps bloquants.....	33
Anticorps monoclonaux dirigés contre des AT.....	34
1.2.7.3 Immunothérapie à médiation cellulaire.....	34
<i>Les Vaccins</i> .....	34
<i>Transfert adoptif de lymphocytes (ACT)</i> .....	36



<b>1.3 Les molécules responsables du recrutement des cellules immunitaires dans les tumeurs.....</b>	<b>37</b>
1.3.1 Les chimiokines.....	37
1.3.1.1 Généralités.....	38
<i>Induction de chimiokines par les tumeurs.....</i>	<i>40</i>
<i>Induction de récepteurs de chimiokines.....</i>	<i>40</i>
<i>Blocage des chimiokines ou des récepteurs de chimiokines.....</i>	<i>41</i>
<i>Ciblage des modifications post-traductionnelles des chimiokines.....</i>	<i>41</i>
1.3.2 Les molécules d'adhérence.....	41
1.3.2.1 Généralités.....	41
<i>Les sélectines.....</i>	<i>42</i>
<i>Les intégrines.....</i>	<i>42</i>
<i>La superfamille des Immunoglobulines.....</i>	<i>42</i>
<i>Les cadhérines.....</i>	<i>42</i>
1.3.2.2 Implication des molécules d'adhérence dans le recrutement des leucocytes.....	43
<b>1.4 La molécule d'adhérence CD146.....</b>	<b>45</b>
1.4.1 Description.....	45
1.4.1.1 Nomenclature et structure.....	45
1.4.1.2 Expression et régulation de CD146.....	46
1.4.2 Rôle de CD146.....	47
1.4.2.1 L'adhérence médiée par CD146.....	47
1.4.2.2 Rôle de CD146 dans le développement.....	47
1.4.2.3 Implication de CD146 dans la migration et l'invasion cellulaire.....	48
1.4.2.4 Implication de CD146 dans la prolifération et la survie des cellules.....	48
1.4.2.5 CD146 favorise l'angiogenèse.....	49
1.4.3 CD146 dans les cellules immunitaires.....	51
1.4.3.1 Description.....	51
1.4.3.2 Rôle de CD146 dans l'adhérence et la migration des lymphocytes.....	52
<b>Raisonnement et hypothèse.....</b>	<b>52</b>
<b>Objectif du projet de doctorat.....</b>	<b>53</b>
<b>2<sup>ème</sup> Section : Manuscrit I.....</b>	<b>54</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>56</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>57</b>
<b>Materials and methods.....</b>	<b>59</b>

Results .....	62
Discussion .....	65
Acknowledgements.....	68
Figures.....	69
Supplementary data.....	74
References.....	77
<b>3<sup>ème</sup> Section : Manuscrit II.....</b>	<b>79</b>
Abstract.....	83
Introduction .....	84
Patients, Materials and Methods .....	86
Results .....	91
Discussion .....	97
Conclusion.....	100
Acknowledgments .....	101
Tables and figures .....	102
Supplementary data.....	114
References.....	121
<b>4<sup>ème</sup> Section : Discussion, perspectives et conclusions .....</b>	<b>124</b>
<b>4.1 Détermination d'une méthode de désagrégation optimale des tissus tumoraux     ayant un impact minimal sur la biologie des cellules immunitaires infiltrantes.....</b>	<b>126</b>
4.1.1 Retour sur les résultats de notre étude : .....	126
4.1.2 Justification et critique de nos résultats. ....	127
4.1.2.1 Choix du matériel et des méthodes. ....	127
4.1.2.2 Limitations techniques rencontrées. ....	128
4.1.2.3 Choix des paramètres évalués lors de notre étude. ....	129
4.1.3 Perspectives et conclusion.....	131
<b>4.2 La molécule d'adhérence CD146 définit une population de lymphocytes T     intratumorale avec des propriétés suppressives.....</b>	<b>132</b>
4.2.1 Mise en contexte.....	132
4.2.2 Retour sur nos résultats.....	132
4.2.3 Justification et critique du matériel biologique utilisé. ....	133
4.2.4 Interprétation de nos résultats.....	135

4.2.4.1	Phénotype distinct des cellules immunes exprimant CD146 dans les tumeurs.....	135
4.2.4.2	Les facteurs induisant l'expression de CD146.....	138
4.2.5	Conclusions et hypothèses.....	142
4.2.5.1	CD146 augmenterait la capacité de migration des cellules dans la tumeur.....	143
4.2.5.2	CD146 participe au recrutement de cellules immunitaires à la tumeur.....	144
4.2.6	Perspectives.....	147
4.2.6.1	Confirmation de nos hypothèses.....	147
4.2.6.2	Application dans le traitement du cancer.....	149
<b>4.3</b>	<b>Conclusion générale.....</b>	<b>152</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>153</b>
	<b>Annexe I : Curriculum vitae.....</b>	<b>xx</b>
	<b>Annexe II : Manuscrit.....</b>	<b>xxiv</b>
	<b>Annexe III : Manuscrit.....</b>	<b>lv</b>

## Liste des tableaux

### 1<sup>ère</sup> Section : Introduction

Tableau 1 : Incidence et mortalité des cancers au Canada en 2013 (extrait de [1]). ..... 7

### 3<sup>ème</sup> Section : Manuscrit II

Tableau 2 (1<sup>mII</sup>) : Characteristics of kidney cancer patients. .... 102

Tableau 3 (2<sup>mII</sup>) : Characteristics of lung cancer patients. .... 103

Tableau 4 (3<sup>mII</sup>) : Characteristics of breast cancer patients. . .... 104

Tableau 5 (4<sup>mII</sup>) : Characteristics of the three kidney cancer patients selected for microarray gene analysis. .... 105

Tableau 6 (5<sup>mII</sup>) : CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> TH1C have gene signature associated to Treg. .... 111

Tableau 7 (supplementary data 5<sup>mII</sup>): List of genes up-regulated in CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> TIL. .... 118

Tableau 8 (supplementary data 6<sup>mII</sup>): List of genes down-regulated in CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> TIL.... 119

## Liste des figures

### 1<sup>ère</sup> Section : Introduction

Figure 1 : Les 10 caractéristiques d'une cellule cancéreuse (adapté de [25]).	13
Figure 2 : La phase d'élimination de l'immunoédition tumorale (modifié de [65]).	16
Figure 3 : La phase d'équilibre de l'immunoédition tumorale (modifié de [65]).	18
Figure 4 : La phase d'évasion de l'immunoédition tumorale (adapté de [65]).	24
Figure 5 : L'association de l'infiltration des cellules immunes avec le pronostic des patients dans différents types de cancers (extrait de [99]).	26
Figure 6 : Cellules et chimiokines qui coordonnent le microenvironnement tumoral (extrait de [177]).	39
Figure 7 : Cascade d'adhérence des leucocytes (adapté de [186]).	44
Figure 8 : Voies de signalisations induites par CD146 (adapté de [213]).	50

### 2<sup>ème</sup> Section : Manuscrit I

Figure 9 (1 <sup>ml</sup> ) : Effect of disaggregation methods on cell viability.	69
Figure 10 (2 <sup>ml</sup> ): Evaluation of cell surface marker detection after enzymatic treatment of PBMC.	70
Figure 11 (3 <sup>ml</sup> ): Effect of disaggregation methods on TH1C surface marker detection.	71
Figure 12 (4 <sup>ml</sup> ): Effect of disaggregation methods on T lymphocyte proliferation.	73
Figure 13 (supplementary data 1 <sup>ml</sup> ): Marker expression in TH1C extracts from lung, breast, and kidney tumors after treatment.	74
Figure 14 (supplementary data 2 <sup>ml</sup> ): Effect of disaggregation on kidney tumor infiltrating lymphocyte proliferation.	76

### 3<sup>ème</sup> Section : Manuscrit II

Figure 15 (1 <sup>mlII</sup> ) : CD146 expression in CD45 <sup>+</sup> cells.	106
Figure 16 (2 <sup>mlII</sup> ) : Tumor cells induced CD146 expression in CD4 T lymphocytes.	107
Figure 17 (3 <sup>mlII</sup> ) : Necrotic Kidney tumor cells induce CD146 expression in lymphocytes.	109
Figure 18 (4 <sup>mlII</sup> ) : Characterization of CD45 <sup>+</sup> CD146 <sup>+</sup> populations.	110

Figure 19 (5 <sup>mII</sup> ) : Characterization of CD4 <sup>+</sup> TIL population according to CD146 expression. .....	112
Figure 20 (6 <sup>mII</sup> ) : CD4 <sup>+</sup> CD146 <sup>+</sup> TIL are enriched in cells with an immunosuppressive profile. .....	113
Figure 21 (supplementary data 1 <sup>mII</sup> ): Tumor cells induced CD146 expression in CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes. ....	114
Figure 22 (supplementary data 2 <sup>mII</sup> ): Effect of thermal shock on KTCL-140.....	115
Figure 23 (supplementary data 3 <sup>mII</sup> ): Necrotic A-498 do not induced CD146 expression in immune cells. ....	116
Figure 24 (supplementary data 4 <sup>mII</sup> ): Genes similarly modulated among three studied kidney patient CD4 <sup>+</sup> CD146 <sup>+</sup> TIL. ....	117

#### **4<sup>ème</sup> Section : Discussion, perspectives et conclusions**

Figure 25 : L'expression de CD146 dans les CD4 n'est pas liée à l'un des paramètres clinico-pathologiques étudiés.....	134
Figure 26 : Impact de la déplétion en O <sub>2</sub> sur l'expression de CD146 dans les lymphocytes. 140	
Figure 27 : L'expression de CD146 induite dans les cellules immunes lors du contact avec les cellules tumorales.....	142
Figure 28 : Modèle 1 ; Induction de CD146 dans les Treg.....	144
Figure 29 : Modèle 2 ; CD146 participe au recrutement des cellules immunes à la tumeur..	146
Figure 30 : Modèles murins proposés pour notre étude : .....	148
Figure 31 : Caractérisation de l'expression de CD146 dans les cultures de TIIC en hautes-doses IL-2 à partir de fragments tumoraux. ....	150

## Liste des abréviations

AC : Anticorps

ACT : Transfert adoptif de lymphocytes (*adoptive transfert of T cells*)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AJCC : *American Joint Commission on Cancer*

AMP : Adénosine monophosphate

APC : Cellules présentatrices d'antigènes

ARN : Acides ribonucléiques

ARG : Arginase

AT : Antigènes tumoraux

ATP : Adénosine triphosphate

BCR : Récepteur de cellule B (*B-cell receptor*)

C : Région constante

CAM : Molécules d'adhérences (*cell adhesion molecule*)

CAR : Récepteur antigénique chimérique (*chimeric antigen receptor*)

CCIS : Carcinomes canaux *in situ*

CCRCC : Carcinomes rénaux à cellules claires

CD40L : CD40 ligand

CF : Cytométrie en flux

CLIS : Carcinomes lobulaires *in situ*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COX2 : Cyclo-oxygénase 2

CT : Noyau de la tumeur (*core of the tumor*)

CTL : Lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (*cytotoxic T-lymphocytes*)

CTLA-4 : Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (*cytotoxic T-lymphocytes antigen 4*)

DC : Cellules dendritiques (*dendritic cells*)

Dvl : *Dishevelled*

EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

ESL1 : Ligand 1 de la E-sélectine (*E-selectin ligand 1*)

ER : Estrogène

FOXP3 : *Forkhead box p3*

GITR : *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*

GM-CSF : *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*

GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptor*)

GZM: Granzyme

H&E : Coloration hématoxyline et éosine

HEMCCAM : Molécule d'adhérence des cellules hématopoïétiques (*hemopoietic cell adhesion molecule*)

Her-2/neu : Récepteur de croissance épidermique 2 (*Human epidermal growth factor-2*)

Hg : Mercure

HIF : Facteur induit par l'hypoxie (*hypoxia-inducible factor*)

HLA : Antigènes des leucocytes humains (*human leukocyte antigen*)

HSP : Protéines de choc thermique (*heat shock proteins*)

ICAM : Molécule d'adhérence intercellulaire (*intercellular cell adhesion molecules*)

ICOS : *Inducible T-cell costimulator*

iDC : Cellules dendritiques immatures

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN- $\gamma$  : Interféron- $\gamma$

Ig : Immunoglobulines

IHC : Immunohistochimie

IL : Interleukines

IM : Marge invasive (*invasive marge*)

iTreg : Lymphocyte T régulateur inductible

JAM-A : Molécule d'adhérence de jonction A (*junctional adhesion molecule A*)

JNK : *C-jun amino-terminal kinase*

LAG-3 : Gène 3 d'activation des lymphocytes (lymphocyte-activation gene 3)

LFA-1 : *lymphocyte function-associated antigen 1*

LMP : Protéine de bas poids moléculaire (*low molecular weight protein*)



Mac-1 : *Macrophage antigen 1*

MCAM/Mel-CAM : Molécule d'adhérence des mélanomes (*melanoma cell adhesion molecule*)

MCAM-l : *Melanoma cell adhesion molecule long*

MCAM-s : *Melanoma cell adhesion molecule court*

MDSC : Cellules myéloïdes suppressives (*myeloid-derived suppressor cells*)

MET-CAM : *Metastasis cell adhesion molecule*

MFI : Intensité de fluorescence moyenne (*mean fluorescence intensity*)

MMP : Matrice métalloprotéinase

MSC : Cellules souches mésenchymateuses (*mesenchymal stem cells*)

NGF : Facteur de croissance du tissu nerveux (*nerve growth factor*)

NK : Cellules *natural killer*

NKT : Cellules T *natural killer*

NOS : *Nitric-oxyde synthases*

NRP-1 : Neuropiline-1

NSCLC : Carcinomes dits « non à petites cellules » (*non-small-cell lung carcinoma*)

nTreg : Lymphocytes T régulateurs naturels

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*)

PCR : *Polymerase chain reaction*

PECAM : *Platelet-endothelial adhesion molecules*

PGE2 : Prostagladine E2

PHA : Phytohaémagglutinine

PD-1 : *Programmed-death-1*

PR : Progestérone

pRB : Protéine du rétinoblastome

PRCC: Carcinome rénal papillaire (*papillary renal cell carcinoma*)

PSGL1 : *P-selectin glycoprotein ligand 1*

RNS : Espèces réactives de l'azote (*reactive nitrogen species*)

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

SCLC : Carcinomes dits « à petites cellules » (*small-cell lung carcinoma*)

SEP : Sclérose en plaques  
TAM : Macrophage anti-inflammatoires (*tumor associated macrophage*)  
TAP : *Transporter associated with antigen processing*  
TCR : Récepteur des cellules T (*T-cell receptor*)  
TGF- $\beta$  : Facteur de croissance des tumeurs  $\beta$  (*tumor growth factor- $\beta$* )  
Th : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup> *helper*  
Thf : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup> *helper* folliculaire  
TIIC : Cellules immunes infiltrant les tumeurs (*tumor infiltrating immune cells*)  
TIL : Lymphocytes infiltrant les tumeurs (*tumor infiltrating lymphocytes*)  
TLR : Récepteur de type Toll (*Toll like receptor*)  
TLS : Structures lymphoïdes tertiaires (*tertiary lymphoid structures*)  
TNF : Facteur de nécrose tumorale (*tumor necrotic factor*)  
TNM : *Tumor-node-metastasis*  
TRAIL : *Tumor necrosis factors related apoptosis inducing ligand*  
Treg : Lymphocyte T de type régulateur  
UICC : *Union for International Cancer Control*  
UV : Ultraviolets  
V : Région variable  
VCAM : *Vascular cell adhesion molecules*  
VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire (*vascular endothelial growth factor*)  
VEGFR-2 : Récepteur 2 du facteur de croissance endothélial vasculaire  
VLA4 : *Very late antigen 4*  
VVO : Organites vesiculo-vacuolaires (*vesiculo-vascular organelle*)

*À Chantal, Jean-Claude, Guerlain, Laïla et Alex*

*Et à mes proches emportés par le cancer*

*Anne-Odile, Bernard et Joëlle.*

## Remerciements

Jamais je n'aurais pensé faire un doctorat, jamais je n'aurais cru aller jusqu'au bout et pourtant aujourd'hui c'est l'accomplissement de ces 5 ans et demi que je présente dans ce mémoire. J'aimerais vraiment remercier toutes ces personnes qui m'ont entourée, conseillée, qui m'ont aidée à faire avancer mon projet et surtout qui ont cru en moi...

Pour commencer, la personne qui m'a dit un jour « Cécile, pour faire un doctorat il faut avoir des flammes dans les yeux, dans les tiens, je vois un incendie... ». Réjean, merci d'avoir vu en moi le potentiel que je n'avais jamais décelé. Merci de m'avoir accueillie, conseillée, orientée et surtout merci de m'avoir donné l'opportunité d'être la femme que je suis aujourd'hui.

Merci à mon co-directeur Jean-François pour tes conseils et ta confiance. Ta bonne humeur et ton originalité qui font de toi un être unique.

Un énorme merci à mes amis/famille/coéquipiers. Je souhaite à tout le monde de travailler avec des personnes aussi incroyables que vous. Je commence par mes deux plus longues relations à vie, mes piliers :

Alex, je voulais te mettre en co-premier auteur sur ma thèse, mais je ne pouvais pas... Tu sais à quel point je te dois tout et à quel point je suis reconnaissante de toute l'aide que tu as pu m'apporter. J't'aime Alexandre Reuben !

Laïli, tu es tellement une merveilleuse amie qui a su m'écouter et être présente dans ma vie au lab et dans ma vie personnelle. Merci pour tout ma belle. Je te souhaite de devenir une grande Dame en recherche et je n'ai aucun doute sur tes capacités. Crois en toi comme tu as cru en moi.

À Marie-Andrée, ma Texane qui est bien trop loin à présent, mais qui a été là dès le tout début de mon aventure québécoise. Merci ma Marie, tu es à la base de mon savoir, c'est toujours un plaisir d'échanger avec toi et de te savoir là malgré la distance.

À Pam, le nouveau moteur du lab, merci pour ta générosité, ton rire ravageur, tes conseils et ton aide.

Je tiens à remercier les nouveaux membres du labo, David, Anne, Nadia, les anciens Jean-Daniel, Dominique et Jessica pour leur aide et leurs conseils. Je remercie également Stéphanie et Urszula pour leur travail pour la banque de tissus du sein avec laquelle j'ai pu réaliser mon projet. Merci à Jason de m'avoir donné un coup de main au début de mon projet ainsi qu'à Kouloud.

Je souhaite également remercier tous les patients et toutes les personnes qui ont participé à me fournir des échantillons biologiques et particulièrement Dr Martin, Dr Liberman, Dr Latour, Dr Lattouf, Vicky et Louise. Merci pour votre implication dans la recherche.

Merci aux personnes qui ont siégé sur mes comités et qui m'ont donné de très bons conseils pour l'avancement de mon projet : Dre Nathalie Arbour, Dr Yves St-Pierre et Dr Francis Rodier.

Je souhaite remercier tous les membres de l'ICM et particulièrement à Maral, Julie et aux Nathalie qui organisent des levées de fonds pour améliorer la qualité de vie des étudiants.

Merci à toutes les personnes qui m'ont apporté de l'aide technique ou des conseils : Dr Dominique Gauchat, Guillaume Chouinard, Dr Francis Rodier, Dr John Stagg, Véronique Barrès, Catherine Larochelle, Sandy Pelletier, Dr Euridice Carmona, Sandra Pommey, Dr Simon Turcotte, Eva d'Hennezel et tous ceux que j'ai oubliés...

Je souhaite remercier mon amour Guerlain pour ton écoute, pour m'avoir soutenue tout au long de mon processus d'écriture. Merci d'être si compréhensif et d'être à mes côtés dans tous mes projets.

Merci à mes copines pour leur écoute et leurs messages de soutien, les soupers et d'avoir partager des moments de bonheur et de craquage : Pauline, Marinette, Clem, Ingrid, Coco, Val, Virg.

Et je souhaite finir par remercier mes parents, Chantal et Jean-Claude. Vous êtes d'incroyables parents qui ont toujours tout fait pour que je ne manque de rien dans ma vie. Merci pour votre amour, merci de toujours croire en moi et merci d'être toujours présents. Je suis fière d'être votre fille.

# **1<sup>ère</sup> Section : Introduction**

Objectif général et structure de la thèse, Introduction,  
Raisonnement et Hypothèse

## **Objectif général et structure de la thèse**

L'objectif général de cette thèse de doctorat consiste à apporter de nouvelles connaissances à la caractérisation de l'infiltration immunitaire dans les tumeurs afin qu'elle puisse être utilisée comme indicateur pronostic de la maladie et permettre de développement de nouvelles thérapies.

La **1<sup>ère</sup> Section** décrit l'importance des cellules immunitaires dans la progression tumorale et la mise en place du contexte immunitaire dans une tumeur. La **2<sup>ème</sup> Section** est constituée d'un manuscrit publié, rapportant l'étude comparative des effets de trois méthodes de désagrégation de tissus sur les cellules immunes infiltrantes et l'identification de la méthode optimale minimisant l'effet sur leur biologie. La **3<sup>ème</sup> Section** est composée d'un deuxième manuscrit dans lequel nous avons caractérisé l'expression de la molécule d'adhérence CD146 dans les cellules immunes infiltrant des tumeurs du sein, du rein et du poumon ainsi que l'origine de cette expression. Enfin, la **4<sup>ème</sup> Section** est constituée de la discussion, des perspectives et de la conclusion de notre projet.

### **1.1 Le Cancer.**

#### **1.1.1 Épidémiologie.**

D'après l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer est la 7<sup>e</sup> cause de mortalité dans le monde, provoquant 1,5 million de décès en 2011. Au Canada, la Société canadienne du cancer rapporte que près de la moitié des Canadiens (41 % des femmes et 46 % des hommes) développeront un cancer au cours de leur vie et qu'un Canadien sur quatre en mourra [1]. Cette maladie occupe le premier rang des causes de décès dans notre pays (29,8 % du nombre total de décès) avec, selon les estimations, 187 600 nouveaux cas de cancer diagnostiqués et 75 500 décès en 2013. L'augmentation du nombre de nouveaux cas au cours de ces 30 dernières années est attribuée à la croissance démographique du pays et au vieillissement de sa population, plutôt qu'à l'augmentation du risque de cancer. Malgré cette incidence élevée, on observe une baisse appréciable du nombre de décès (76 200 décès en 2010). Ceci s'explique par l'augmentation des connaissances sur les causes et le

développement du cancer, l'évolution des traitements, l'amélioration de la qualité de vie des patients, mais aussi la prévention (la sensibilisation à l'effet du tabagisme, à la consommation d'alcool, à l'exposition prolongée au soleil et au bronzage artificiel, la réduction des infections, et la diminution des expositions professionnelles aux agents cancérigènes). Selon *l'American Institute for Cancer Research* et le *World Cancer Research Fund* [2], environ le tiers des 12 principaux cancers peuvent être évités en changeant de mode de vie avec une alimentation saine, la pratique régulière d'activités physiques et le maintien d'un poids santé.

Le cancer est un fardeau sur un plan personnel, apportant des séquelles physiques, émotionnelles et spirituelles aux patients qui peuvent persister même après le traitement de la maladie. C'est aussi un fardeau économique pour une société en terme de coûts de santé publique. En 2000, le cancer était la quatrième maladie la plus coûteuse au Canada.

### **1.1.2 Typologie des cancers.**

Les cancers sont classés en fonction de leur origine. Ainsi on définit trois principaux types de cancers :

- Les carcinomes qui sont des tumeurs de l'épithélium ou de la peau. Ils peuvent être classés en deux principales catégories : les adénocarcinomes qui se développent dans un organe ou une glande et les carcinomes à cellules squameuses dont l'origine est l'épithélium squameux. Ce sont les formes de cancer les plus fréquentes qui représentent 90% des cancers.
- Les sarcomes : ces tumeurs prennent leur origine dans l'os, le cartilage, les tissus adipeux, les muscles, les vaisseaux sanguins ou dans d'autres tissus conjonctifs. Ils représentent moins de 1 % des nouveaux cancers. Ils sont plus souvent observés chez les enfants et les jeunes adultes. On distingue deux types de sarcomes, selon qu'ils se développent dans les tissus conjonctifs communs (fibrosarcome, liposarcome, léiomyosarcome, rhabdomyosarcome, angiosarcome, glomangiosarcome, sarcome synovial, tumeurs stromales gastro-intestinales) ou dans les tissus spécialisés tels que l'os (ostéosarcomes, chondrosarcomes, sarcome d'Ewing).



- Les cancers hématopoïétiques comprennent les cancers des cellules sanguines (les leucémies) et les tumeurs du système lymphatique (les lymphomes hodgkiniens ou non- hodgkiniens).

Dans notre étude, nous avons pris comme modèle trois types de carcinomes dits « solides » avec une forte incidence chez l'Homme, soit les cancers du poumon, du sein et du rein.

### **1.1.3 Le cancer du poumon.**

Le cancer du poumon occupe le deuxième rang des nouveaux cas de cancer au Canada en 2013, aussi bien chez la femme que chez l'homme (respectivement 13,3 % et 13,8 % des nouveaux cas de cancer; **Tableau 1 A**). Chez l'homme, le taux d'incidence diminue depuis 1998 dû à la baisse du tabagisme. Il est cependant en augmentation chez la femme et reste le plus mortel (27,2 % chez l'homme et 26,3 % chez la femme des décès par cancer; **Tableau 1 B**).

Ce cancer est principalement dû à des mutations causées par des agents carcinogènes contenus dans la fumée de cigarette ou dans les polluants industriels. On recense deux types histologiques principaux comprenant les carcinomes dits « non à petites cellules » (NSCLC) et les carcinomes dits « à petites cellules » (SCLC, 14% des cancers aux États-Unis). Cependant dans la dernière décennie, les nouvelles avancées thérapeutiques ont permis de classer les NSCLC en adénocarcinomes (eux-mêmes subdivisés en sous-types papillaires, solides, acinaires ou bronchioloalvéolaires, qui représentent 38 % des cancers aux États-Unis), carcinomes épidermoïdes (à cellules squameuses, 20 % des cancers aux États-Unis) et les carcinomes à cellules larges (3 % des cancers aux États-Unis) [3]. Les SCLC sont généralement issus de la transformation des cellules épithéliales neuroendocrines alors que les NSCLC sont issus de la transformation des cellules épithéliales bronchiques ou alvéolaires. Les SCLC représentent la forme la plus agressive des cancers du poumon, possédant une capacité de prolifération cellulaire très rapide et un fort pouvoir métastatique rendant ainsi souvent inutile une approche thérapeutique chirurgicale. Cependant, les traitements préconisés pour les SCLC sont la chimiothérapie seule ou en combinaison avec de la radiothérapie. Pour

des formes localisées, la survie à 2 ans est de 17 % après des traitements en chimiothérapie seule et de 23 % après des traitements radio/chimiothérapeutiques.

Trois types de traitements sont généralement utilisés pour traiter les NSCLC : la chirurgie (lobectomie, pneumectomie, wedge), la chimiothérapie et la radiothérapie. Pour des tumeurs inopérables, non métastasés, un traitement radio/chimiothérapeutique permet d'obtenir une survie d'environ 5 % à 10 % à 5 ans.

#### **1.1.4 Le cancer du sein.**

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué chez la femme (26,1 % des nouveaux cas de cancer en 2013; **Tableau 1 A**) et correspond au deuxième cancer le plus mortel (13,9 % des décès par cancer; **Tableau 1 B**) même si le taux de mortalité par cancer du sein au Canada a atteint le niveau le plus bas jamais enregistré depuis 1950. La généralisation du dépistage par mammographie permet de réaliser un diagnostic plus précoce de la maladie, de traiter les tumeurs quand elles sont très petites, de réduire la mortalité et de permettre des traitements moins lourds et moins traumatisants que la chimiothérapie ou la chirurgie dite « mutilante » (ablation complète du sein).

Les facteurs étiologiques de ce cancer sont :

- Les facteurs génétiques en rapport avec des mutations génétiques telles que les gènes BRCA 1, 2 ou 3 [4]
- Les facteurs hormonaux, qui sont représentés par des règles précoces (avant 12 ans), une ménopause tardive (après 50 ans), l'absence de grossesse ou une grossesse tardive (après 35 ans).
- L'obésité et les facteurs alimentaires : l'augmentation du risque semble en rapport avec la production d'œstrogènes au niveau du tissu conjonctif.

L'OMS propose une classification histologique des cancers du sein [5]. On y retrouve les cancers *in situ* ou non-invasifs qui sont délimités par une membrane basale. On distingue parmi eux les carcinomes canauxiers *in situ* (CCIS) représentant 85 à 90 % des cancers du sein *in situ*, et les carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS). Ces tumeurs sont classées en fonction du grade nucléaire de Holland [6].

On retrouve également les cancers invasifs ou infiltrants qui ont la capacité de se disséminer aux ganglions ou à d'autres organes. Ils sont classés entre autres selon le grade histopronostique de Scarff Bloom et Richardson et la présence des récepteurs hormonaux. Les tumeurs dites "triples négatives", n'expriment pas le récepteur à l'estrogène (ER), à la progestérone (PR) et le récepteur de croissance épidermique 2 (Her-2/*neu*). Ce sont des cancers avec de mauvais pronostics pour lesquels il y a peu de traitements. Les différents types histologiques de cancers invasifs sont : les adénocarcinomes canaux infiltrants (75 %), les adénocarcinomes lobulaires infiltrants (4 à 11 %), les adénocarcinomes tubuleux, les carcinomes mucineux ou colloïdes muqueux, les adénoïdes kystiques, les carcinomes apocrines et les carcinomes médullaires.

Enfin, on retrouve aussi les cancers du sein inflammatoires qui sont plus rares, représentant 1-4 % des cas de cancer du sein.

Les traitements les plus couramment utilisés contre le cancer du sein sont :

- La chirurgie qui peut être radicale (mastectomie) ou conservatrice (tumorectomie).
- La radiothérapie.
- La chimiothérapie qui peut être donnée en situation métastatique, en adjuvant ou en néo-adjuvant (Epirubicine, Cyclophosphamide, Adriamycine, Vinorelbine).
- L'immunothérapie : dans le cas du cancer du sein, l'anticorps spécifique au récepteur Her-2/*neu* (Trastuzumab) est administré aux patientes afin d'inhiber la croissance tumorale contrôlée par Her-2.
- L'hormonothérapie est adressée aux cancers dits hormonosensibles (50 à 60 % des cas) à savoir qui possèdent des récepteurs hormonaux cytoplasmiques et nucléaires ER+ et/ou PR+ ce qui est particulièrement le cas dans les tumeurs bien différenciées. Elle est préconisée afin de réduire la quantité d'œstrogènes arrivant au niveau des cellules cancéreuses (tamoxifène, létrozole, anastrozole, exemestane).

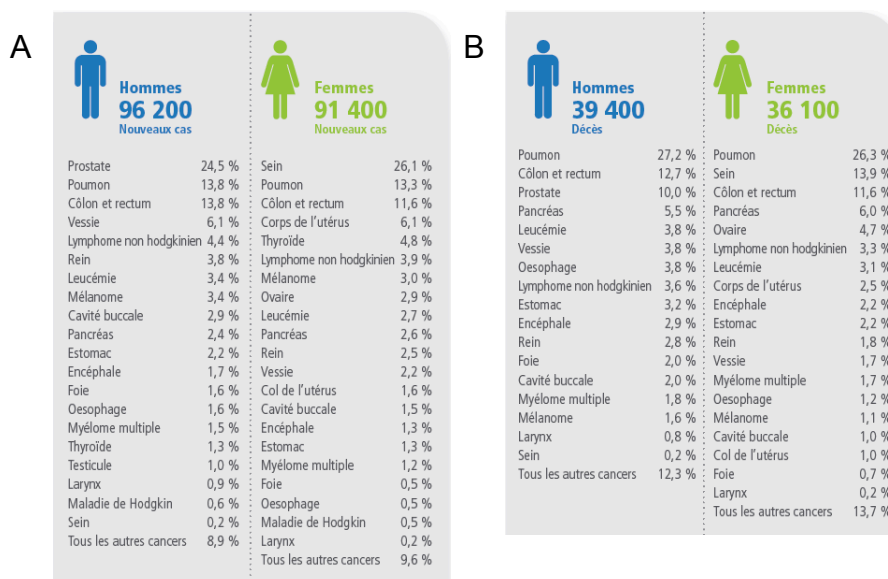
### **1.1.5 Le cancer du rein.**

Le cancer du rein se retrouve au 6<sup>e</sup> rang des cancers nouvellement diagnostiqués chez les hommes (3,8 % des nouveaux cas) et 11<sup>e</sup> rang chez la femme (2,5 % des nouveaux cas)

(Tableau 1 A) et représente respectivement 2,8 % et 1,8 % de mortalité par cancer (Tableau 1 B).

La classification actuelle des cancers du rein a été proposée par l'OMS en 2004 [7]. On retrouve parmi les tumeurs rénales malignes les adénocarcinomes, répartis en différents types histologiques : les carcinomes rénaux à cellules claires (CCRCC-80 à 90 %), les carcinomes rénaux papillaires de type 1 ou 2 (PRCC- 10 à 15 %), les carcinomes rénaux chromophobes (4 à 5 %), les carcinomes des tubes collecteurs et les carcinomes inclassables. Le pronostic du cancer du rein dépend du TNM (voir paragraphe 1.1.5), du grade de Fuhrman, de l'état général du patient et de l'invasion des parois vasculaires. Le grade nucléaire de Fuhrman distingue 4 grades selon la taille du noyau et du nucléole [8].

Le traitement du cancer du rein repose sur les traitements locaux de chirurgie (nephrectomie partielle, simple ou radicale) de radiofréquence et de cryoablation, et les traitements généraux en thérapies ciblées et en immunothérapie.



**Tableau 1 : Incidence et mortalité des cancers au Canada en 2013 (extrait de [1]).**

Données émises par la Société canadienne du cancer en collaboration avec Statistique Canada, les registres provinciaux et territoriaux du cancer et l'agence de la santé publique du Canada. (A) Distribution en pourcentage du nombre estimatif de nouveaux cas de cancer, selon le sexe, Canada, 2013. (B) Distribution en pourcentage du nombre estimatif de décès par cancer, selon le sexe, Canada, 2013.

### 1.1.6 Le TNM.

L'American Joint Commission on Cancer et l'Union for International Cancer Control (AJCC/UICC) ont établi une classification nommée le TNM afin d'évaluer le stade d'une tumeur [9]. C'est un facteur pronostic qui est reconnu internationalement et qui est adapté à différents types de cancers.

La lettre « T » pour « tumeur », prend en compte la taille de la tumeur, mais aussi l'invasion ou la localisation.

La lettre « N » pour « *node* » ou ganglion, dépend de la présence d'atteinte ganglionnaire, du nombre de ganglions affectés et de leur localisation.

La lettre « M » pour « métastase », détermine la présence de métastases locales ou distales.

Ce « grade tumoral » donne une estimation du degré de progression de la tumeur au moment de la résection chirurgicale. Cependant, cette classification, utilisée depuis plus de 80 ans, fournit une information pronostique limitée et ne permet pas de prédire la réponse aux traitements des patients. Il est reconnu que les résultats cliniques peuvent varier considérablement chez les patients d'un même stade histologique [10].

### 1.1.7 Transformation des cellules en cellules cancéreuses.

Les cellules peuvent en tout temps subir des transformations génétiques (mutations) qui vont aboutir à un état malin de la cellule.

#### 1.1.7.1 Origine de la malignité des cellules.

Les transformations provoquant la malignité d'une cellule peuvent être transmises de façon héréditaire ou acquise par des facteurs exogènes. Parmi les facteurs exogènes, on retrouve :

- Les infections par des pathogènes tels que les bactéries et les virus : c'est le cas, par exemple, de la bactérie *Helicobacter pylori* qui peut provoquer des cancers intestinaux [11]. Pour les virus, on recense : les virus B et C de l'hépatite (cancer hépatocellulaire ou cancer primitif du foie [12, 13]), le virus de l'immunodéficience humaine (lymphomes [14], sarcome de Kaposi [15]), le virus T-lymphotropique

humain (leucémie T de l'adulte et lymphome [16]), le virus Epstein-Barr (lymphome de Burkitt [17], carcinome naso-pharyngé [18]), le virus de l'herpès humain type 8 (sarcome de Kaposi [19]), le papillomavirus humain (cancer du col de l'utérus et de l'œsophage [20]) et bien d'autres encore.

- L'exposition aux radiations (rayons X, gamma, ultras violets (UV)...) est responsable de l'induction de mutations dans les cellules induisant de nombreux cancers et particulièrement de la peau (mélanomes) et la thyroïde.
- L'exposition à des agents carcinogènes tels que les produits chimiques, les groupes de produits chimiques, les mélanges complexes, les agents physiques... Ces agents ont été classés par divers organismes internationaux en fonction de leur carcinogénicité.
- L'inflammation chronique.

#### *1.1.7.2 Types de transformations.*

Les cellules transformées possèdent un génome très différent des cellules normales. Ces différences génétiques incluent des mutations, des délétions, des insertions, des aberrations chromosomiques telles que des translocations chromosomiques, des gains ou des pertes de chromosomes entiers (aneuploïdie). Les cellules cancéreuses vont donc présenter des changements structuraux, par exemple, la perte de certains suppresseurs ou le gain d'oncogènes.

L'accumulation de mutations peut compromettre les systèmes de surveillance qui normalement amènent les cellules génétiquement endommagées en sénescence ou en apoptose, c'est le cas du gène p53 [21].

On note également des mutations induisant des dysfonctionnements des mécanismes de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) comme c'est le cas pour les protéines NBS1, l'hélicase BLM, la kinase ATM ou BRCA1 et BRCA2.

Le caryotype aneuploïde peut être propagé de façon stable dans une population de cellules tumorales [22], mais très souvent le nombre de chromosomes continue de changer. Cette variation est appelée « l'instabilité chromosomique » [23].

### *1.1.7.3 Conséquences des perturbations génétiques dans la cellule.*

La variabilité des mutations retrouvée dans les cellules cancéreuses fait que l'on retrouve une grande hétérogénéité de tumeurs d'un individu à l'autre, même au sein d'un même type histologique, mais aussi une diversité des sites de développement [24], ce qui rend les traitements du cancer difficiles.

Cependant, il existe des propriétés communes que l'on peut généraliser aux cellules cancéreuses. Hanahan et Weinberg [25] ont proposé un modèle avec 10 caractéristiques fondamentales attribuées aux cellules cancéreuses brièvement résumées dans ce chapitre (**Figure 1**).

#### *Le potentiel de réplication illimité.*

Le trait le plus fondamental des cellules cancéreuses implique leur capacité à maintenir la prolifération chronique. En culture *in vitro*, les cellules normales de l'organisme ne peuvent réaliser seulement un nombre limité de réplifications successives, alors que les cellules cancéreuses ont un potentiel réplcatif illimité qui reflète leur capacité à générer des tumeurs macroscopiques. Cette capacité est appelée l'immortalisation. Ce phénomène peut s'expliquer par les phénomènes décrits par la suite, mais aussi par la présence des télomères aux extrémités des chromosomes. Les télomères sont des régions hautement répétitives d'ADN non codant, dont la longueur va limiter le nombre de divisions possibles. Lorsque l'extrémité du chromosome a été "rongée" par les divisions successives, un signal antiprolifératif se déclenche et la cellule entre en sénescence. Dans les cellules tumorales, plusieurs mécanismes aboutissent à l'activation de la télomérase qui a la capacité d'allonger et maintenir l'ADN télomérique [26].

#### *L'autosuffisance en facteurs de croissance.*

Les cellules normales vont contrôler la production et la libération de signaux de stimulation de croissance afin de contrôler leur entrée et leur progression dans le cycle cellulaire assurant ainsi l'homéostasie de la cellule. Les cellules cancéreuses, par le dérèglement de ces signaux, deviennent maîtresses de leur propre destin. Elles vont ainsi produire des facteurs de croissance et exprimer des récepteurs apparentés qui entraineront la prolifération par une stimulation autocrine. Elles peuvent aussi envoyer des signaux afin de

stimuler les cellules normales adjacentes (cellules du stroma) afin de leur fournir divers facteurs de croissance. Elles vont également exprimer des récepteurs de surface afin d'être hypersensibles à ces facteurs de croissance.

Des mutations somatiques dans le génome de certaines cellules tumorales humaines induisent une activation de cascades de signalisation habituellement déclenchées par des récepteurs de facteurs de croissance activés [27].

#### *L'insensibilité aux signaux antiprolifératifs.*

Les cellules tumorales ont la capacité de contourner des programmes puissants de régulation négative de la prolifération cellulaire en bloquant l'action ou en induisant des mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs. C'est le cas pour le gène codant la protéine du rétinoblastome (pRB) [28]. Afin d'assurer l'homéostasie tissulaire, les cellules possèdent un mécanisme "d'inhibition de contact" qui est aboli dans différents types de cancers [29, 30].

#### *L'évasion à la mort cellulaire.*

Les cellules tumorales mettent en place une variété de stratégies pour limiter ou contourner la mort cellulaire programmée, soit l'apoptose. La plus commune est la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur p53. Mais elles peuvent aussi augmenter l'expression des régulateurs anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL [31], des signaux de survie comme IGF1/2 [32], ou sous-exprimer les facteurs pro-apoptotiques comme Bax, Bim, Puma [33].

#### *L'induction de l'angiogenèse.*

Comme les tissus normaux, afin d'obtenir un apport en nutriments et en oxygène et d'évacuer les déchets du métabolisme et le dioxyde de carbone, la tumeur met en place un nouveau système de vascularisation. Cependant, ce réseau vasculaire nouvellement formé diffère de celui trouvé dans les tissus normaux, présentant des anomalies structurales et fonctionnelles [34]. Ces anomalies entraînent une circulation sanguine irrégulière et lente qui se traduit par la diminution de la quantité d'O<sub>2</sub> résultant ainsi en la formation de zones hypoxiques. Hors, l'hypoxie est un facteur qui contribue à la prolifération et la progression tumorale [35]. Les cellules tumorales souffrant d'un manque d'oxygène sécrètent des facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) afin de



maintenir l'expansion néoplasique et bloquer l'effet des inhibiteurs de l'angiogenèse [36]. La production de VEGF induite par l'hypoxie se fait via l'activation de la transcription du gène HIF-1 $\alpha$  [37].

#### *Le potentiel métastatique et l'invasion tissulaire.*

Ce phénomène complexe implique la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules tumorales, qui désigne le passage d'un groupe de cellules tumorales d'origine épithéliales à une forme mésenchymateuse [38]. Les cellules perdent alors leur adhésion par la diminution d'expression de molécules d'adhérence qui assurent la liaison intercellulaire au sein des tissus tels que la E-cadherine [39] et augmentent l'expression de protéases (métalloprotéinases) qui dégradent la lame basale qui borde l'épithélium [40]. Le modèle proposé par Talmadge et Fidler en 2010 fait part de la complexité des étapes mises en place ainsi que du rôle des différents acteurs lors de ce phénomène [41].

#### *La reprogrammation de leur métabolisme énergétique.*

Les cellules tumorales doivent ajuster leur métabolisme énergétique afin de stimuler la croissance des cellules et leur division. Elles vont reprogrammer leur glycolyse et donc leur production d'énergie en un état appelé "la glycolyse aérobie" [42]. Cette dépendance de la glycolyse peut être encore accentuée en conditions hypoxiques qui sont présentes dans de nombreuses tumeurs. Dans ces conditions, les tumeurs peuvent contenir deux sous-populations de cellules cancéreuses : une sous-population mieux oxygénée, constituée de cellules dépendantes du glucose qui sécrète du lactate et une sous-population hypoxique, qui importe et utilise le lactate produit par leurs voisines comme leur principale source d'énergie [43].

#### *L'induction de l'inflammation.*

Il est reconnu depuis longtemps que les tumeurs sont infiltrées par les cellules de l'immunité innées et adaptatives [44]. Cette capacité est développée dans le chapitre suivant : « l'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales ».

#### *L'évasion à la réponse immune antitumorale.*

La théorie de la surveillance immunitaire propose que les cellules et les tissus soient constamment surveillés par un système immunitaire actif. De cette surveillance en résulte la

reconnaissance et l'élimination de la grande majorité des cellules cancéreuses naissantes. Malgré le fait que le système immunitaire fonctionne comme un obstacle important à la formation et la progression de la tumeur, il n'en reste pas moins que les cellules cancéreuses arrivent à contourner ce mécanisme de surveillance par de nombreuses stratégies qui seront développées dans le chapitre suivant : « l'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales ».

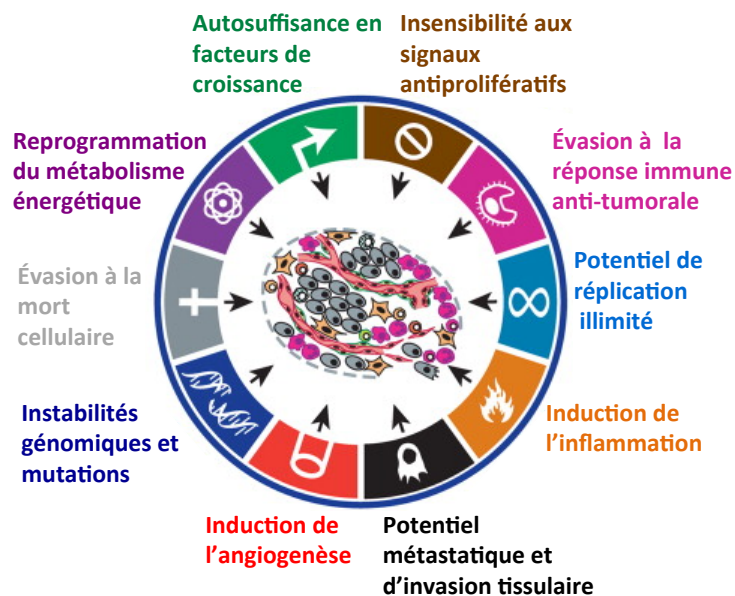


Figure 1 : Les 10 caractéristiques d'une cellule cancéreuse (adapté de [25]).

## 1.2 Rôle du système immunitaire dans l'évolution des tumeurs.

L'évolution d'une tumeur est fortement influencée par le microenvironnement dans lequel elle se développe. Les cellules tumorales vont ainsi interagir avec les cellules endothéliales, les fibroblastes, les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques, les cellules immunitaires, les cytokines, les chimiokines et les produits du métabolisme cellulaire. Dans cette section, nous nous intéresserons au rôle du système immunitaire dans l'évolution de la tumeur.

### 1.2.1 L'évolution du concept d'immunosurveillance.

L'idée que le système immunitaire apporte une protection face aux tumeurs comme il le fait pour des agents infectieux a été proposée par Ehrlich en 1909 [45]. Un demi-siècle plus tard, Burnet et Thomas proposent que les lymphocytes participent à l'élimination des cellules transformées [46]. Ainsi naît le concept d'immunosurveillance [47]. Cependant, ce concept est démenti par Stutman en 1974 qui montre que les souris *nudes*, qui ne possèdent pas de thymus et donc peu de lymphocytes, ne forment pas plus de tumeurs spontanées ou induites par un agent chimique (le méthylchroranthrène) que des souris contrôles [48]. Dès le début des années 2000, les progrès réalisés sur les modèles de souris mutées (mutation pour l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), la perforine et les cellules *natural killer* (NK)), ont montré l'importance de la réponse immunitaire innée et adaptative contre le développement de tumeurs spontanées [49-51]. Cependant, le concept d'immunosurveillance ne prend en compte qu'une seule facette du rôle du système immunitaire dans l'évolution des tumeurs. Les travaux de Shankaran montrent que le système immunitaire peut aussi favoriser l'émergence de tumeurs primaires dont l'immunogénicité est réduite [50]. Dunn propose alors en 2002 le modèle de l'immunoédition afin d'expliquer le rôle du système immunitaire dans la progression tumorale [52, 53] qui se résume en trois étapes : l'Élimination, l'Équilibre et l'Évasion [54] (**Figures 2-3-4**).

### 1.2.2 Reconnaissance et élimination des cellules tumorales par le système immunitaire

La phase d'élimination reprend le concept d'immunosurveillance précédemment mentionné. La réponse immunitaire qui s'y déroule est plus ou moins similaire à celle observée lors de la défense de l'hôte aux agents pathogènes microbiens et implique à la fois la réponse innée et adaptative.

Cette phase va être activée par des cellules transformées à la suite de l'échec intrinsèque des mécanismes de suppression et différents *stimuli* induits par ces cellules comme le remodelage stromal qui résulte en la perturbation du tissu local. Ces cellules transformées vont devenir immunogènes exprimant à leur surface des protéines que le système immunitaire va reconnaître comme des protéines du « non-soi ». Ces protéines sont appelées des antigènes tumoraux (AT). Il existe quatre catégories d'AT (revu dans [55]) : les antigènes des cellules

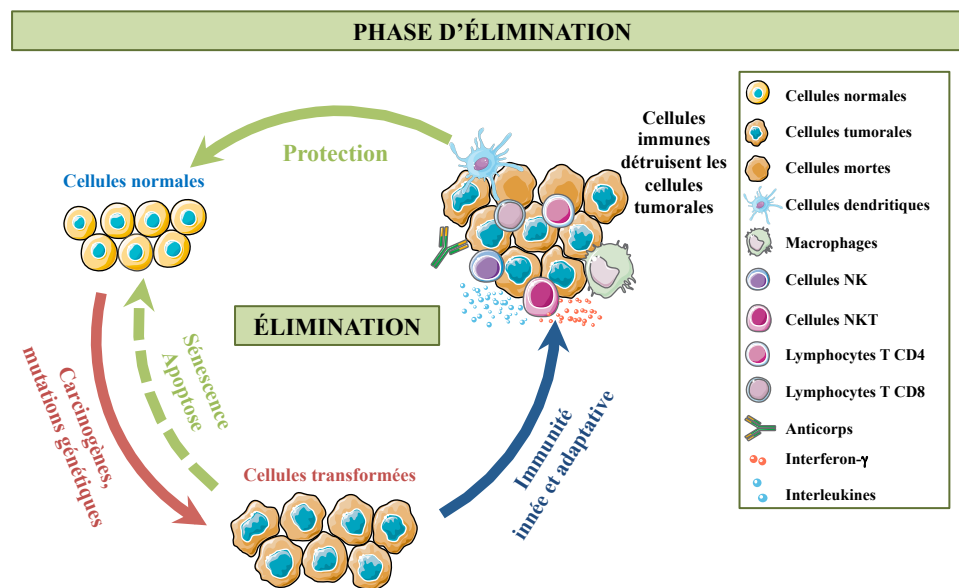
germinales, les antigènes de différenciation, les antigènes surexprimés et les antigènes spécifiques aux tumeurs uniques ou partagés par différents types de cancers.

Ces événements vont être reconnus comme des signaux de danger par les cellules de l'immunité innée c'est-à-dire les cellules NK, les cellules T *natural killer* (NKT) les cellules  $\gamma\delta$ , et les macrophages qui vont agir en première ligne de défense. L'interaction des cellules tumorales avec les NK et les macrophages induit la libération d'IFN- $\gamma$ , de chimiokines et d'interleukines (IL) dans le microenvironnement [56] qui ont un effet antiprolifératif [57], pro-apoptotique [58] et angiostatique [59]. Les macrophages, par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), et les NK via des mécanismes dépendant du *Tumor Necrosis Factors related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), du système Fas/FasL ou de la perforine, vont induire la mort d'un nombre important de cellules tumorales [60, 61]. Cette mort va générer des débris cellulaires et la libération d'AT dans le microenvironnement qui seront phagocytés ou endocytés puis dégradés en peptides pour enfin être présentés par les cellules dendritiques (DC) qui sont des cellules présentatrices d'antigènes (APC) professionnelles. Les DC, ainsi activées, vont alors se rendre dans les ganglions lymphatiques afin d'activer l'immunité adaptative. Pour ce faire, elles vont présenter des peptides antigéniques via leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires dits « *helper* » (Th). Ces cellules possèdent un récepteur des cellules T (TCR) capable de reconnaître spécifiquement un peptide présenté par CMH de classe II [62]. Les lymphocytes T CD4 vont alors acquérir un profil Th1, Th2, Th17 ou lymphocyte T de type régulateur (Treg) et migrer à la tumeur pour jouer leur rôle.

D'un autre côté, les lymphocytes T CD8 dits « cytotoxiques » (CTL) vont eux aussi être activés. Leur TCR va reconnaître des peptides plus courts (8 à 10 acides aminés vs 13 pour les CMH classe II [63]) présentés par des CMH de classe I. Les CMH de classe I sont exprimés par la plupart des cellules dont les cellules cancéreuses ou par les DC et présentent des peptides de la voie de dégradation des protéines endogènes [62]. Cependant, les peptides tumoraux exogènes dégradés par les DC peuvent être également présentés à la surface de CMH de classe I par des voies de présentation dite « croisées » [64]. L'activation des lymphocytes T CD8 va être aidée par les cytokines sécrétées par les Th1 (IL-2 et IFN- $\gamma$ ) afin

de produire une réponse antitumorale *via* la voie granzyme B (GZMB)/perforine ou par le système Fas/FasL induisant la mort des cellules tumorales par apoptose [62].

Les lymphocytes B vont quant à eux aider à la présentation antigénique en tant qu'APC (revue dans [65]). Lorsqu'ils vont reconnaître un AT par leur récepteur de cellule B (BCR), celui-ci est internalisé puis dégradé et présenté à la surface de son CMH de classe II [62]. Les lymphocytes T CD4 vont être activés via les liaisons CMH classe II/ TCR et CD40/ CD40L qui induit l'expression de B7 à la surface du lymphocyte B se liant au CD28 qui fournit le signal de co-stimulation nécessaire à l'activation du lymphocyte T CD4. Cette activation résulte en la polarisation Th2 et à la production de cytokines qui permettront la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes qui à leur tour vont produire des anticorps (AC) [62]. C'est la « réponse humorale antitumorale ». La phase d'élimination résulte habituellement en l'éradication des cellules transformées et en la protection du tissu.



**Figure 2 : La phase d'élimination de l'immunoédition tumorale (modifié de [66]).**

L'élimination commence suite à la transformation de cellules normales et à l'échec des mécanismes interne de mort. Des mécanismes extrinsèques sont alors induits impliquant une réponse immunitaire innée et adaptative conduisant à la protection du tissu.

### 1.2.3 L'équilibre.

Cette phase se définit comme une période pendant laquelle le système immunitaire et le cancer vivent en harmonie dans le corps. Le système immunitaire n'est pas en mesure d'éliminer complètement les cellules cancéreuses, mais ne lui permet pas non plus de progresser ou de métastaser. Ce processus peut être maintenu pendant plusieurs années jusqu'à ce que toutes les cellules de la tumeur soient éliminées ou bien qu'elles se développent en une masse solide [67]. Les mécanismes de cette phase sont mal compris, car elle est difficile à identifier, en particulier chez l'humain. En effet, il n'existe pas de biomarqueurs clairement identifiés dû au faible nombre de cellules tumorales présentes dans cette phase.

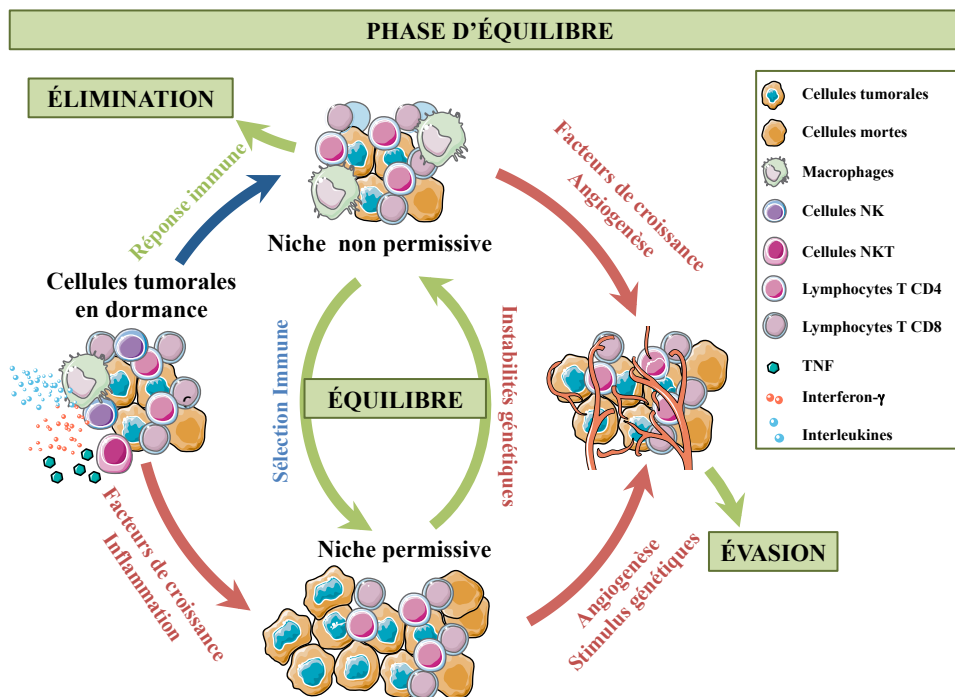
La phase d'équilibre permettrait d'expliquer le phénomène de rechute observé dans de nombreux cancers après plusieurs années de rémission et donc le fait que certaines cellules tumorales soient restées dans le corps malgré les traitements. Le développement d'une tumeur chez un receveur de greffe d'organe sans sa présence préalable chez le donneur peut suggérer que celle-ci pourrait avoir été présente chez le donneur dans un état de dormance [68]. Les travaux réalisés sur la souris par Koebel *et al* prouvent eux aussi l'existence de la phase d'équilibre. En injectant à des souris de faibles doses d'un agent cancérigène (le méthylchoranthrène) et en mettant de côté les souris développant des tumeurs, ils ont démontré que les souris restantes formaient une petite masse stable au site d'injection qui se développait en formant une masse tumorale à part entière lorsque certains composants de la réponse immunitaire étaient désactivés [69].

On parle dans la littérature de deux phases dans l'équilibre. La première dans laquelle les cellules tumorales restent au repos subissant ni division ni l'apoptose cellulaire [70]. Dans ce cas, le système immunitaire peut éventuellement éliminer toutes les cellules tumorales, et conduire à l'élimination de la tumeur. La deuxième phase implique que la prolifération est équilibrée par l'apoptose induite par le système immunitaire, ce qui explique la taille constante des tumeurs [71].

Cette deuxième phase de l'équilibre serait maintenue uniquement par l'immunité adaptative et plus particulièrement par les lymphocytes T [72], contrairement à l'élimination et l'évasion qui impliquent en plus l'implication des éléments de l'immunité innée [73]. La perte de molécule de CMH de classe I par les cellules cancéreuses montre l'importance des

lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans la prévention la progression de la maladie [74]. L'implication des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et le facteur de nécrose tumorale (TNF), a été également mentionnée [75]. L'immunogénicité des cellules cancéreuses varie également pendant les trois phases de l'immunoédition du cancer. Il a été constaté que, lors de la phase d'équilibre, les cellules tumorales sont plus immunogènes que lors de la phase d'évasion [76].

La phase d'équilibre implique donc l'élimination des cellules tumorales, mais permet de sélectionner des variants dont l'immunogénicité est réduite qui vont échapper au système immunitaire.



**Figure 3 : La phase d'équilibre de l'immunoédition tumorale (modifié de [66]).**

Certaines cellules cancéreuses peuvent résister à l'élimination et se trouver en dormance. Lors de l'étape précoce de l'équilibre, les cellules cancéreuses immunogènes attirent les cellules de la réponse inflammatoire qui maintiennent un contrôle sur la tumeur. Au fil du temps, les cellules tumorales acquièrent des anomalies génétiques qui ne seront pas éliminées par le système immunitaire créant un environnement permissif à leur prolifération.

## 1.2.4 L'évasion des cellules cancéreuses au système immunitaire.

Les cellules cancéreuses vont mettre en place de nombreuses ruses afin de déjouer les stratégies d'élimination du système immunitaire et continuer leur croissance (**Figure 4**).

### 1.2.4.1 Perte de la reconnaissance de la tumeur par cellules du système immunitaire.

Une réponse immunitaire spécifique peut être régulée par la diminution de la présentation antigénique à la surface des cellules tumorales. Celles-ci vont acquérir des défauts impliqués dans la reconnaissance antigénique.

Premièrement, on retrouve une absence ou une diminution d'expression de molécules de CMH de classe I dans de nombreux cancers [77, 78]. Cette perte peut résulter de l'altération des protéines clés dans la machinerie d'apprêtement et de présentation des antigènes, telles que le *transporter associated with antigen processing* (TAP), la tapasine (TAP-associated protein), la  $\beta$ 2-microglobuline, ou les protéines de bas poids moléculaire 2 et 7 (LMP-2, LMP7) [79]. Deuxièmement, on remarque la perte d'expression d'AT dans les cellules tumorales [80]. Finalement, les cellules tumorales peuvent exprimer des molécules *human leukocyte antigen G* (HLA-G) qui sont capables d'inhiber la réponse proliférative des cellules effectrices de l'immunité innée (NK) et adaptative (lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>). Les molécules de HLA-G solubles peuvent se lier aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> induisant leur apoptose par la voie Fas/Fas-L [81].

### 1.2.4.2 Résistance aux signaux de mort.

Les cellules tumorales sont capables de résister aux mécanismes apoptotiques sécrétés par les cellules effectrices. Il en existe deux principaux soit la voie GZMB/perforine (Ca<sup>2+</sup> dépendante) et les voies dépendantes des « récepteurs de mort » (Ca<sup>2+</sup> indépendante). En ce qui concerne la première voie, les cellules tumorales vont exprimer un inhibiteur du GZMB le PI-9/SPI-6 bloquant ainsi son effet [82].

Les récepteurs de mort sont des membres des récepteurs TNF tel que FAS (CD95) ou TRAIL. La liaison entre ces récepteurs exprimés à la surface des cellules tumorales avec leur ligand (respectivement Fas-L et TRAIL) induit une cascade de signalisation qui aboutit en l'apoptose de la cellule [83]. Ces voies peuvent être bloquées à différents niveaux, soit par expression de protéines bloquant la voie cellulaire comme c'est le cas de la protéine inhibitrice



FLICE pour la voie de TRAIL [84] ou par la baisse voir même la perte totale d'expression de ces récepteurs.

La cellule tumorale peut exprimer ou sécréter des récepteurs tronqués et donc non fonctionnels interagissant avec les ligands et les rendant inactifs.

#### *1.2.4.3 Induction de l'anergie des cellules T activées.*

De nombreuses molécules exprimées par les cellules tumorales vont directement ou indirectement bloquer les cellules effectrices :

##### *L'expression des CTLA-4 et PD-1.*

Les cellules tumorales expriment l'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) et la molécule Programmed-death-1 (PD-1). CTLA-4 va se fixer aux molécules CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) et PD-1 à un membre de la famille B7 : le B7-H1 (PD-L1) exprimées par les DC [85]. Cette liaison, entre en compétition avec le CD28 des cellules T effectrices. Il n'y aura donc pas de stimulation de leur TCR ce qui aboutit à l'inactivation des cellules effectrices, leur arrêt dans le cycle cellulaire et la production d'IL-10 qui va influencer l'activité des Treg [86].

##### *L'expression du facteur de croissance des tumeurs $\beta$ (TGF- $\beta$ ).*

Le TGF- $\beta$  sécrété par les cellules tumorales, inhibe l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules effectrices en induisant une baisse de la régulation des composants du TCR telle que la perte de la chaîne CD3- $\zeta$  dans les lymphocytes T [87]. Il est aussi connu pour bloquer la réaction cytotoxique des CTL en réprimant la transcription des gènes codant pour la perforine, le GZMB A et B, le Fas-L, et l'IFN- $\gamma$  [88] ou en induisant un profil Treg aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [89].

##### *L'expression de PGE2.*

La prostaglandine E2 (PGE2) produite par la cyclo-oxygénase COX2 surexprimée dans plusieurs types de tumeur, oriente la plasticité des cellules Th vers un profil Th2 [90] ou Treg [91].

### *L'expression du VEGF.*

VEGF ne permet pas seulement d'augmenter la vascularisation des tumeurs. Similairement à l'IL-10, il va interférer dans la présentation antigénique en compromettant la maturation différenciation des cellules dendritiques [92]. Il a été aussi suggéré que le VEGF pouvait participer à l'induction et au maintien des Treg dans la tumeur [93, 94].

### *L'expression d'enzymes immunosuppressives.*

Des enzymes responsables du métabolisme de certains acides aminés sont connus pour avoir un rôle immunosuppresseur. C'est le cas de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) responsable de la dégradation du tryptophane [95], des arginases (ARG1 et ARG2) [96] et des nitric-oxyde synthases (NOS1, NOS2 et NOS3) responsables de la dégradation de l'arginine. La déplétion de ces acides aminés dans le microenvironnement et la présence de leurs produits de dégradation apportent un effet immunosuppresseur en bloquant la prolifération et l'activation des cellules effectrices et en induisant l'expansion de cellules Treg [97].

Une activité accrue de ces enzymes a été observée dans plusieurs lignées cellulaires tumorales [98] ainsi que dans différents cancers primaires humains [99].

#### *1.2.4.4 Recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives.*

Les cellules cancéreuses vont avoir la capacité de recruter, en sécrétant de nombreux facteurs comme des chimiokines, des cellules immunitaires qui ont un rôle immunosuppresseur et qui vont aider la croissance tumorale afin de recruter ces cellules immunosuppressives [100]. C'est le cas des Treg, des *Myeloid-Derived Suppressor Cells* (MDSC), des DC immatures (iDC), les lymphocytes B régulateurs, les macrophages anti-inflammatoires (TAM) qui vont mettre en place de nombreux mécanismes afin de bloquer l'activité des cellules effectrices. Pour la mise en contexte de notre projet, seules les Treg et leurs mécanismes d'action ont été détaillés dans cette partie.

### *Les lymphocytes T régulateurs.*

Les Treg ont été décrits la première fois en 1990 par Sakaguchi *et al.* en tant que sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (environ 5% du nombre total de cellules T CD4<sup>+</sup>) [101] qui possèdent une activité suppressive sur les différentes cellules du système immunitaire.

On définit deux types de Treg : les Treg naturels (nTreg) qui sont générés dans le thymus et les Treg inductibles (iTreg) qui sont issus de la différenciation de lymphocytes T CD4 naïfs en périphérie. Plus on obtient des informations sur ces cellules et plus il est difficile de définir un phénotype et un profil fonctionnel précis, ce qui peut être expliqué par la grande plasticité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [102, 103] et particulièrement des Treg [104].

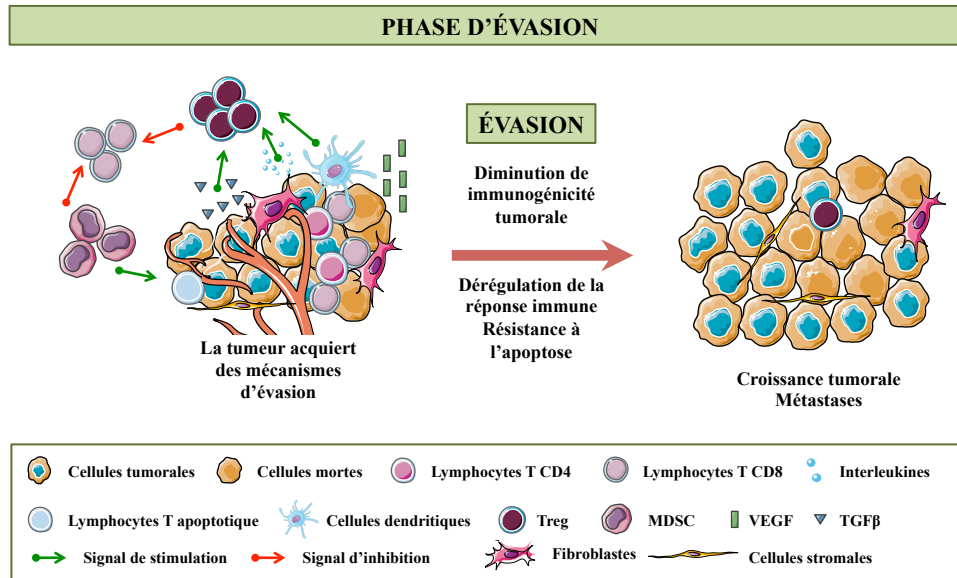
Chez les sujets sains, leur phénotype est défini par l'expression du facteur de transcription *forkhead box p3* (FOXP3) [105] et l'expression constitutive de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25). Cependant, seules les cellules CD4<sup>+</sup> T CD25<sup>high</sup> sont considérées comme immunosuppressives [106]. D'autres molécules de surface sont exprimées sur les Treg.

C'est le cas de CTLA-4, le *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor* (GITR), l'*inducible T-cell costimulator* (ICOS), PD-1 [107, 108], les récepteurs des chimiokines CCR4, CCR6, et CCR7 [109-111]. Toutes ces molécules sont exprimées par Treg humains, mais aucune n'est spécifique aux Treg. L'expression des ectonucléotidases CD39 [112] et CD73 [113] et l'absence d'expression de la peptidase CD26 [114] et du récepteur à l'IL-7 (CD127) ont permis de phénotyper les Treg : nTreg : CD45RA<sup>+/-</sup> CD25<sup>hi</sup> FOXP3<sup>hi</sup> CD39<sup>+</sup> CD73<sup>+</sup> /CD26<sup>-</sup> et iTreg: CD45RA<sup>-</sup> CD25<sup>lo</sup> CD127<sup>+</sup> FOXP3<sup>lo</sup> CD39<sup>+</sup> CD73<sup>+</sup> CD26<sup>-</sup>. Duhon et ses collaborateurs ont identifié quatre sous-populations distinctes Treg analogues aux populations CD4 Th exprimant les mêmes récepteurs de chimiokines proposant ainsi que les Treg se spécialisent dans leur capacité à contrôler uniquement certaines sous-populations de lymphocytes T effecteurs [115]. Il est essentiel de se demander si les Treg qui s'accumulent dans des conditions pathologiques spécifiques, comme le cancer, conservent ces propriétés phénotypiques.

Les Treg circulant dans le sang de donneurs sains sont essentiellement des nTreg, tandis que ceux présents chez les patients atteints de cancer sont enrichis en iTreg [116] favorisés par un microenvironnement riche en TGF- $\beta$  [117] et en adénosine [118], VEGF, IL-10, PGE2. L'hypoxie peut réguler la différenciation en Treg par une augmentation du facteur de transcription HIF1 $\alpha$  qui à son tour va induire FOXP3 [119]. Les nTreg vont être attirés et vont migrer au site tumoral par chimiotactisme induit par des chimiokines sécrétées par la tumeur telle que CXCL12 [120].

Les Treg utilisent trois grandes catégories de mécanismes afin d'immunosupprimer les cellules effectrices *via* des molécules de surface, l'activité enzymatique et la sécrétion de facteurs solubles [121]:

- **Les molécules de surface** : Parmi les molécules de surface exprimées par les Treg, le CTLA-4, le gène 3 d'activation des lymphocytes (LAG-3) et la protéine neuropiline-1 (NRP-1) jouent un rôle dans la progression de la tumeur, principalement par la modulation de l'activation et des fonctions des DC. En particulier CTLA-4 et LAG-3, dont la liaison, respectivement aux récepteurs CD80/CD86 (B7-1/2) [122] et au CMH de classe II [123] des DC, altère la capacité de ces APC à activer des cellules T effectrices. L'interaction des Treg et des DC se fait aussi via NRP-1 qui assure la stabilité de l'interaction entre ces deux cellules et permet de supprimer efficacement l'action des DC [124].
- **L'activité enzymatique** : La suppression peut être médiée par l'activité enzymatique des Treg via CD39/CD73 (revue en [125]), le GZMB, et la perforine. L'expression de GZMB et de perforine induit l'apoptose des cellules cibles par cytolyse [126]. En outre CTLA-4 favorise l'expression IDO et la production du métabolite kynurénine pro-apoptotique.
- **La sécrétion de facteurs solubles** : Les Treg sécrètent plusieurs cytokines immunosuppressives, qui modulent directement les fonctions T effectrices (TGF- $\beta$  [127], IL-10 [128] et IL-35 [129]), ou indirectement en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF [130].



**Figure 4 : La phase d'évasion de l'immunoédition tumorale (adapté de [66]).**

Une fois que le microenvironnement est favorable, la tumeur va mettre en place de nombreux mécanismes afin de diminuer son immunogénéicité et même atténuer l'action des cellules effectrices antitumorales.

### 1.2.5 L'infiltration immunitaire comme marqueur pronostic du développement tumoral.

De nombreuses études suggèrent que le développement de la tumeur est contrôlé par le système immunitaire de l'hôte. L'infiltration immunitaire peut être un marqueur pronostic permettant de prédire les réponses cliniques aux traitements.

Récemment, une méta-analyse a résumé plus de 120 articles publiés mettant en évidence l'importance de la localisation, la nature, la densité de l'infiltration immunitaire dans le développement tumoral [100, 131]. Ces paramètres permettent de définir le « contexte immunitaire » d'une tumeur qui est propre à chaque patient [132].

#### 1.2.5.1 La nature de l'infiltration.

Des analyses histopathologiques de tumeurs humaines ont fourni la preuve que tous les types de cellules immunitaires peuvent être trouvées dans une tumeur, y compris les macrophages, les DC, les mastocytes, les granulocytes les MDSC, les cellules NK, les lymphocytes naïfs et mémoires, les cellules B et les cellules T effectrices comprenant les

différents sous-types de lymphocytes T : les cellules Th (Th1, Th2, Th17, Treg, les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Thf)) et des CTL.

Une forte infiltration lymphocytaire a été rapportée comme étant associée à un bon résultat clinique dans de nombreux types de tumeurs [73, 133], y compris mélanome, cancers du sein, de la vessie, de l'ovaire, du côlon, du rein, de la prostate et du poumon (résumé en [100]). Une densité élevée de CTL avec un profil de cellules mémoires CD45RO<sup>+</sup> a été clairement associée à une meilleure survie des patients. La capacité des cellules T effectrices-mémoires à se rappeler d'un antigène précédemment rencontré conduit à une réponse protectrice. De plus, ces cellules sont maintenues pendant de longues périodes de temps ce qui permet d'entraîner une immunité à long terme [134].

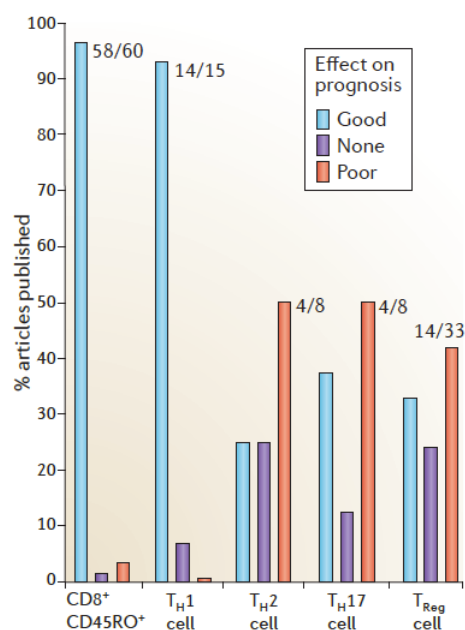
La corrélation entre les résultats cliniques et l'analyse des sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a donné des résultats contradictoires et ont fait l'objet de nombreux débats dans la dernière décennie (**Figure 5**). C'est le cas des cellules Treg, dont certaines études corrélient leur infiltration avec une meilleure survie globale des patients, d'autres avec un effet nul et d'autres rapportent leur association à un mauvais pronostic (revue dans [100] tableau 1). Les Treg peuvent être nocifs quand ils bloquent les CTL antitumoraux ou bénéfiques quand ils diminuent l'inflammation chronique. Ces différences dans le pronostic peuvent s'expliquer par le fait que ces corrélations se basent sur l'expression de marqueurs non restreints à cette population (CD25 et FOXP3) pour l'identification des cellules immunosuppressives.

On retrouve aussi cette contradiction pour les cellules Th17. Dans les modèles murins, l'IL-17 (cytokine produite par les cellules Th17) favorise la croissance des tumeurs chez les animaux immunodéficients en maintenant l'inflammation chronique, tandis qu'elle favorise le rejet de la tumeur chez les animaux immunodéprimés compétents en augmentant la réponse antitumorale [135, 136].

Les cellules Th2, par l'activation des lymphocytes B ou par la production de la cytokine immunosuppressive (IL-10), semblent être associées aux tumeurs agressives. Cependant, ce n'est pas un phénomène général, car les cellules Th2 sont également associées dans certains cancers à un effet de protection [137]. Les lymphocytes Th1, par leur production d'IFN- $\gamma$ , sont fortement associés à un bon résultat clinique pour tous les types de cancer.

Les cellules NK, qui ont un rôle protecteur dans les premiers stades du développement de la tumeur, se trouvent dans un état d'anergie lorsque la tumeur se développe (effet du TGF- $\beta$ ). Elles n'auront donc que peu d'effets une fois le cancer est cliniquement décelable.

Le rôle des lymphocytes B est lui aussi controversé. Ils peuvent agir comme des APC et par conséquent, être important afin d'induire l'activation des lymphocytes T qui aident à contrôler l'invasion tumorale [138]. Mais par leur production d'IL-10 et d'immunoglobulines (Ig)G, ils peuvent activer les macrophages pro-tumoraux (M2) [139], convertir les CD4<sup>+</sup> en Treg [140] et ainsi participer aux premiers stades de la cancérogenèse et à la progression métastatique.



**Figure 5 : L'association de l'infiltration des cellules immunes avec le pronostic des patients dans différents types de cancers (extrait de [100]).**

Résultat de l'analyse de 124 articles résumant l'impact de l'infiltration de lymphocytes T cytotoxiques mémoires (CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>), des Treg et des différentes sous population de Th (Th1, Th2, Th17) sur le pronostic des patients atteints d'un cancer (20 types de cancers étaient analysés). « Good » signifie que le type cellulaire est associé à un bon pronostic, « None » signifie qu'il n'y a pas de corrélation et « Poor » signifie que les cellules sont associées à un mauvais pronostic.

La variabilité des résultats obtenus dans les études de corrélation entre l'infiltration immunitaire et le pronostic de la maladie peut s'expliquer de différentes manières :

- Elle peut refléter le fait que les tumeurs ont des phénotypes différents et que les cellules sont sujettes à un microenvironnement propre à chaque patient. Les cytokines sécrétées dans ce milieu tumoral vont influencer la migration des cellules immunitaires, mais aussi jouer sur leur plasticité (voir chapitre 1.3.1 Les chimiokines).
- Elle peut être due à la qualité des méthodes de détections, des outils et au choix des marqueurs utilisés pour phénotyper les cellules immunes (voir section 1.2.6 : Méthodes de caractérisation des cellules immunitaires infiltrantes).

#### 1.2.5.2 La localisation de l'infiltration.

Les analyses histologiques ont montré que la distribution de l'infiltration immunitaire varie entre les types de tumeurs. On définit différentes zones d'infiltration : le noyau de la tumeur (*core of the tumor*, CT), les marges invasives (IM) et les structures lymphoïdes tertiaires adjacentes (TLS). Une corrélation entre la densité de cellules immunitaires dans chaque région de la tumeur (CT et IM) et de l'évolution de la maladie a été montrée dans le cancer colorectal [141]. De plus, l'analyse combinée des régions tumorales a amélioré la précision de la prédiction de la survie pour les différents groupes de patients par rapport à l'analyse d'une seule région.

Les macrophages, les mastocytes, les granulocytes et les MDSC se trouvent dans le CT et la IM. Il est établi que l'inflammation chronique et la présence de macrophages M2 favorisent la croissance tumorale [142]. Les cellules NK sont présentes dans le stroma et ne sont pas en contact avec les cellules tumorales. Les cellules B sont surtout présentes dans la IM des tumeurs en croissance et au sein des TLS [143]. Les lymphocytes T, en particulier des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, peuvent être situés dans la IM, mais peuvent aussi être dans CT. Peu de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques se trouvent dans TLS qui sont similaires aux follicules secondaires dans les ganglions lymphatiques et qui contiennent surtout des lymphocytes T naïfs et des lymphocytes T mémoires, des lymphocytes B et des DC matures [143].



Les DC immatures sont distribuées dans le CT, en contact direct avec les cellules tumorales ou dans le stroma environnant. Les DC matures se concentrent dans TLS, en contact étroit avec cellules T naïves. Les TLS peuvent être des sites dans lesquels des réponses immunitaires primaires et/ou secondaires sont générées.

Le fait que les populations de cellules immunitaires fonctionnelles soient situées dans différentes zones de la tumeur, et que celles-ci varient entre les différents types de cancer suggère que ces cellules immunes peuvent avoir des rôles différents dans le contrôle de la tumeur.

#### *1.2.5.3 La densité.*

En plus de la nature de l'infiltration immunitaire et de sa localisation, la densité de l'infiltrat immunitaire va être déterminante pour l'évolution de la tumeur. La densité de l'infiltrat va être variable d'une tumeur à une autre et peut être corrélée aux résultats cliniques dans les cancers. Dans les cancers colorectaux, une forte densité de cellules lymphocytes CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> GZMB<sup>+</sup> corrèle avec un bon pronostic [131]. Cependant, il est clair que la densité n'est pas le seul facteur à prendre en considération quant à l'influence que peuvent avoir les lymphocytes infiltrant (TIL) sur les tumeurs. Une étude a démontré qu'un infiltrat immunitaire abondant est l'indicateur d'une survie significativement prolongée chez des patients atteints d'un cancer du sein âgés de moins de 50 ans, alors qu'il n'influence pas la survie chez les 50 ans et plus. Ceci peut s'expliquer par un défaut de fonction des cellules effectrices chez les personnes plus âgées.

#### *1.2.5.4 Immunoscore*

La prévalence de l'infiltrat immunitaire des tumeurs, plus que le statut de la tumeur, pourrait être un indicateur clé de la récurrence, des métastases et du résultat clinique. Il est donc important d'ajouter les marqueurs immunologiques à la classification TNM afin de renforcer le pronostic de la maladie. Le groupe de Jérôme Galon a proposé de quantifier l'infiltrat immunitaire *in situ* dans le cancer colorectal [131, 144] et de mettre un système de notation désigné sous le terme d'« immunoscore ». Il repose sur la numération de populations de lymphocytes largement démontrées comme des cellules ayant un rôle dans la réponse immunitaire antitumorale (résumé dans [144]) exprimant les marqueurs CD3/CD45RO,

CD3/CD8 ou CD8/CD45RO à la fois dans le CT et dans la IM [141]. L'immunoscore fournit un score allant de 0 (I0) lorsque de faibles densités de ces types de cellules se trouvent dans les deux régions, à 4 (I4) lorsque de fortes densités se trouvent dans les deux régions [145].

La valeur pronostique de l'utilisation de ces critères immunitaires a été démontrée chez les patients atteints d'un cancer colorectal à un stade précoce (stade TNM I- II) pour prédire la survie et la rechute des patients [141]. Cinq ans après le diagnostic de leur maladie, seulement 4,8 % des patients avec des densités élevées de lymphocytes CD8<sup>+</sup> et CD45RO<sup>+</sup> ont eu une récurrence de leur tumeur, et 86,2 % ont survécu. En revanche, la tumeur a récidivé chez 75 % des patients ayant de faibles densités de ces populations de cellules immunes et seulement 27,5 % ont survécu.

L'immunoscore peut être considéré comme un bon marqueur pronostique, car il est réalisable en routine dans les laboratoires de pathologie clinique, simple, peu coûteux, rapide, robuste, reproductible et, quantitatif [146]. L'ajout de marqueurs supplémentaires peut être d'intérêt afin d'affiner sa valeur pronostique.

### **1.2.6 Méthodes de caractérisation des cellules immunitaires infiltrantes.**

Une compréhension des mécanismes par lesquels un « contexte immunitaire » favorable s'établit et se maintient dans la tumeur est essentielle afin de guider les thérapies innovantes. Cette compréhension passe par une caractérisation poussée des différentes populations de cellules immunes infiltrant les tumeurs (TIIC) et de leur rôle dans le microenvironnement tumoral. Il est essentiel de maîtriser les méthodes, les outils et les marqueurs associés à ces aspects afin que ces caractérisations reflètent avec exactitude le contexte immunitaire de la tumeur.

L'analyse phénotypique des cellules immunes par l'identification de biomarqueurs de leurs signatures moléculaires, ou de leurs caractéristiques génétiques permet d'identifier le type cellulaire et de déterminer leur orientation fonctionnelle même si celle-ci doit être confirmée par un essai fonctionnel.

Dans cette section, nous passerons en revue les principes de certaines méthodes de caractérisation phénotypiques des cellules ainsi que les avantages et les inconvénients qui leurs sont propres.

Coloration hématoxyline et éosine.

L'évaluation de la présence des cellules immunitaires peut être réalisée par une coloration avec de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E) sur des coupes de tissus. Cette technique peu coûteuse permet de localiser l'infiltrat immunitaire dans un tissu, mais ne permet, toutefois, pas d'évaluer la nature de cet infiltrat.

#### *1.2.6.1 L'immunohistochimie*

L'immunohistochimie (IHC) est une méthode d'identification et de localisation des cellules sur une coupe de tissu.

Cette technique permet une caractérisation précise des antigènes spécifiques exprimés à la surface des cellules infiltrantes par des anticorps de haute affinité. Ces anticorps peuvent être couplés à des enzymes telles que la peroxydase, la  $\beta$ -galactosidase ou la phosphatase alcaline, catalysant une réaction et produisent une couleur stable qui peut être visualisée par microscopie optique.

Cette technique est très utilisée par les pathologistes, mais elle possède des limites :

- Méthode longue et difficile à mettre en œuvre.
- Le nombre de marqueurs/analyse est limité.
- Il est difficile de co-localiser plusieurs marqueurs sur une même cellule.
- Les protéines peuvent être dénaturées lors du protocole de marquage ce qui rend leur détection impossible.

Cependant, les tissus étant fixés (paraffine, OCT) ce qui permet le maintien et la réactivité des antigènes dans le temps.

#### *1.2.6.2 L'immunofluorescence.*

Cette technique a le même principe que l'immunohistochimie cependant, les anticorps utilisés sont marqués d'un fluorochrome (substance chimique qui émet de la lumière lorsqu'elle est excitée à une certaine longueur d'onde). Elle a l'avantage de permettre

l'identification et la localisation des différentes protéines à la surface et dans la cellule et de réaliser des co-localisations. Cependant, cette technique nécessite de bons contrôles afin de distinguer un signal positif du bruit de fond. Les colorations sont peu stables et sensibles à la lumière. Enfin, l'appareillage de détection est très coûteux.

#### 1.2.6.3 *La cytométrie de flux.*

Ce procédé permet l'analyse individuelle (cellule par cellule) et multiparamétrique (taille, granulosité, expression de protéines de surface, de cytokines, de facteurs de transcription, cycle cellulaire...) des cellules. Il permet d'évaluer la nature et la densité, mais pas la localisation des différentes cellules immunitaires d'un tissu tumoral. En utilisant des anticorps de haute affinité couplés à des fluorochromes, il est possible de détecter des protéines exprimées à la surface et à l'intérieur (même dans le noyau) de la cellule allant jusqu'à plus de 10 marqueurs par analyse. Cette technique permet d'analyser et de quantifier des populations de cellules rares et de trier physiquement des cellules en fonction de leurs propriétés et même d'analyser le sécrétome de cellules par des essais de sécrétion de cytokines [147].

Cette technique est très utilisée en laboratoire de recherche. Cependant, l'analyse par cytométrie de flux ne peut être réalisée sur le tissu tumoral tel quel et requiert une désagrégation de la tumeur en une suspension cellulaire. Malheureusement, cette étape peut induire des changements phénotypiques et fonctionnels de la cellule qui peuvent induire des biais dans leur caractérisation. C'est sur ce fait que nous avons basé notre première étude : *Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation* (voir **Section 2**).

#### 1.2.6.4 *L'analyse d'expression des gènes.*

L'analyse d'expression des gènes d'une cellule peut apporter de nombreuses informations sur son phénotype et sa fonction. Elle peut se réaliser en ciblant certains gènes avec des techniques telles que la *polymerase chain reaction* (PCR) ou le Northern blot, ou en réalisant l'analyse globale de milliers de gènes en une seule expérience par des techniques de séquençage ou d'hybridation sur des puces à ADN.

Même si l'analyse des gènes donne des informations d'intérêt sur la cellule dans une situation biologique donnée, elle doit être confirmée par une analyse d'expression de la protéine. De plus, ce sont des techniques lourdes à mettre en place, qui sont très coûteuses et le grand nombre de résultats obtenus nécessite un traitement informatique et statistique adéquat.

### **1.2.7 L'immunothérapie des cancers:**

L'immunothérapie consiste manipuler le système immunitaire afin d'induire une réponse cliniquement significative contre le cancer. Ce concept repose principalement sur le fait que les AT, peuvent être reconnus par les cellules effectrices de la réponse cellulaire ou humorale du système immunitaire et initier une réponse immunitaire anti-tumorale. L'identification ces AT a ouvert la voie au développement de multiples stratégies immunothérapeutiques qui sont classées en trois catégories : l'immunothérapie à base de cytokines, l'immunothérapie utilisant des anticorps bloquants et l'immunothérapie cellulaire. Ces stratégies ont pour but d'améliorer l'immunité spécifique à la tumeur, de maintenir l'activation des cellules T effectrices ou d'augmenter le nombre de cellules T spécifiques de la tumeur.

#### *1.2.7.1 L'immunothérapie à base de cytokines.*

La réponse immunitaire est un processus complexe qui se déroule suite à la communication entre les différentes cellules immunitaires et leur environnement. Ces interactions complexes sont médiées, entre autre, par des cytokines. Ce sont des protéines ou des glycoprotéines de faible poids moléculaire qui sont sécrétées principalement par les cellules immunitaires mais qui peuvent aussi être sécrétées par d'autres types de cellules en réponse à un stimulus. Elles vont jouer un rôle essentiel dans le développement de la réponse immunitaire cellulaire et humorale mais aussi dans contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire aboutissant à guérison tissulaire. Il existe plus de 200 cytokines connues dont la spécificité d'action est assurée, entre autre, par la présence de récepteurs spécifiques exprimés par les cellules cibles.

Certaines cytokines ont montré leur capacité à moduler la tumeur et son environnement ce qui explique l'intérêt d'utiliser ces molécules comme immunothérapie du cancer. Ainsi, plusieurs cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IFN- $\alpha$ , l'IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  et le *granulocyte*

*macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) ont été testées en essai clinique [148].

L'IL-2 a été la première cytokine caractérisée dans le modèle animal et humain pour une utilisation systémique. Dr. Steven Rosenberg et ses collègues ont utilisé l'IL-2 comme agent de première ligne pour le traitement de certains patients atteints d'un mélanome ou d'un cancer du rein. Suite à ce traitement, ils ont observé une réponse anti-tumorale chez environ 20% des patients avec 3 à 5% des patients présentant une régression complète et durable de leur tumeur [149, 150].

Cependant, un traitement avec des doses élevées d'IL-2 peut être responsable d'effets secondaires sévères tel que le "Syndrome de perméabilité vasculaire" qui se traduit par la libération massive de cytokines telles que l'IL-1, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Ces cytokines vont entraîner une augmentation la perméabilité des vaisseaux sanguins ce qui engendre de graves mais réversibles conséquences comme l'oedème pulmonaire.

Le traitement systémique à base de cytokines des patients atteints de cancer à un stade avancé a donné des résultats modestes comme traitement de première ligne. Il est aujourd'hui souvent administré en combinaison avec d'autres traitements.

#### *1.2.7.2 L'immunothérapie utilisant des anticorps bloquants.*

Ce type d'immunothérapie du cancer fait appel à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ce sont des immunoglobulines chimériques dirigées contre un épitope. Il existe une gamme d'anticorps disponibles dans le traitement des lymphomes et des leucémies. Cependant, nous attarderons ici sur les anticorps utilisés dans le traitement des tumeurs solides.

#### *Anticorps monoclonaux dirigés contre des inhibiteurs de l'activation des lymphocytes T.*

Le système immunitaire possède différents mécanismes lui permettant de mettre fin à une réponse immune lorsque celle-ci n'est plus nécessaire. Ces mécanismes lui confèrent une certaine tolérance afin d'éviter les réactions auto-immunes ou les réactions inflammatoires chroniques. Certains de ces mécanismes sont intrinsèques à la cellule activée et se regroupent sous l'appellation de signaux d'inhibition. Ces mécanismes, agissent comme des "freins" à la réponse immunitaire, ils deviennent alors des cibles de choix dans une perspective d'immunothérapie contre le cancer. Ce type d'immunothérapie consiste à bloquer les

interactions inhibitrices des cellules T effectrices par un anticorps monoclonal résultant en l'augmentation de la prolifération et de l'activité des cellules effectrices [151]. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur PD-1 (nivolumab, MDX-1106, BMS-936558) ou son ligant PD-L1 (BMS936559) mais aussi des anticorps dirigés contre le récepteur CTLA-4 (ipilimumab, tremelimumab) sont maintenant testés en clinique pour le traitement de nombreux cancers tels que les mélanomes métastatiques, le cancer du rein ou de la prostate [152-154].

#### *Anticorps monoclonaux activateurs des lymphocytes T.*

L'activation immunitaire est strictement régulée par des co-récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T tels que CD28, ICOS, 4-1BB, OX40, CD27 [155]. L'utilisation d'anticorps monoclonaux agonistes de ces récepteurs font actuellement l'objet d'études cliniques afin de maintenir l'activation des cellules T effectrices.

#### *Anticorps monoclonaux dirigés contre des AT.*

L'immunothérapie par anticorps monoclonaux profite de la spécificité qu'offrent les AT dans le traitement contre le cancer. Ainsi, l'anticorps lié à l'épitope se trouvant à la surface de la cellule tumorale peut marquer cette cellule comme une cible aboutissant à sa lyse par le système immunitaire. En effet, suite à la reconnaissance de la partie non liée de l'anticorps par les récepteurs Fc, les cellules NK peuvent procéder à la lyse de la cellule tumorale [156]

Les APC possèdent également des récepteurs Fc leur permettant de phagocyter les particules tumorales liées aux anticorps. Une fois internalisées, les particules sont apprêtées en peptides pour être présentés non seulement par CMH-II, mais également par présentation croisée par CMH-I afin d'activer des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> spécifiques [157].

#### *1.2.7.3 Immunothérapie à médiation cellulaire.*

##### *Les Vaccins.*

Le but général de la vaccination anti-tumorale est la guérison plutôt que la prévention, ce qui diffère de la vaccination anti-virale. Afin qu'un vaccin anti-tumoral soit efficace, il est primordial que l'antigène ciblé puisse être présenté par les APC afin d'engendrer l'activation des lymphocytes T. Il est également essentiel que ces lymphocytes activés puissent par la

suite, développer une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales. La persistance de la réponse antitumorale (mémoire) au-delà de la maladie est également souhaitable.

Les vaccins anti-tumoraux peuvent être classés en 4 grandes catégories. On retrouve notamment les vaccins à base de peptides (incluant les protéines), les vaccins à base de cellules tumorales (incluant les lysats), les vaccins à base de cellules dendritiques et les vaccins par transfert de gènes (incluant l'ADN et les vecteurs viraux) dont le principe est brièvement décrit ici.

- Vaccins à base de peptides :

L'identification de peptides immunogènes dérivés de AT ainsi que l'identification de l'haplotype du HLA (de classe I ou II) pouvant présenter ces peptides a mené au développement de vaccins consistant en l'injection de ces peptides pouvant se lier aux CMH à la surface des cellules tumorales ou être internalisés par les APC et ainsi potentiellement activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> afin d'induire une réponse contre la tumeur.

Bien que des essais cliniques ont montré l'effet bénéfique de ces thérapies, les avantages globaux restent modestes. Les réponses à ces vaccins pourraient être améliorées grâce à l'optimisation d'adjuvants, tels que des agonistes des récepteurs de type Toll (TLR) [158, 159], l'optimisation de la longueur du peptide [160] ou potentiellement en combinant vaccins avec d'autres immunothérapies.

- Vaccins à base de cellules tumorales :

La vaccination à base de cellules tumorales a pour avantage de cibler une plus grande quantité d'AT, caractérisés ou non et de ne pas être restrictif quand au type de HLA du patient. Elle permet de générer des peptides pouvant stimuler les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les T CD4<sup>+</sup>, afin d'éviter l'immunosélection de certains variants tumoraux pouvant contribuer à l'évasion tumorale [161]. La vaccination peut se faire avec des cellules tumorales autologues ou allogéniques. L'utilisation des cellules autologues du patient a pour avantage de considérer que la tumeur peut contenir des AT uniques qui représentent une source d'antigènes très immunogéniques. Les composantes du vaccin à base de cellules tumorales peuvent être préparées à partir de cellules tumorales entières ou à partir de vésicules de cellules tumorales.

- Vaccins à base de DC :

Les DC étant de puissantes cellules présentatrices d'antigènes de par leur capacité particulière à englober, apprêter et présenter les antigènes aux lymphocytes T [162]. Elles



jouent ainsi un rôle crucial dans le déclenchement d'une réponse antigène-spécifique par les lymphocytes T. Ces cellules peuvent donc être utilisées en clinique afin de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale. Plusieurs techniques ont été développées pour mettre à profit les DC dans les vaccins anti-cancer : soit électroporées avec de l'acides ribonucléiques messager (ARNm) codant pour un antigène tumoral [163], fusionnées avec des cellules tumorales [164], chargées avec des peptides dérivés d'AT [165] ou des lysats de cellules tumorales.

- Vaccins par transfert de gènes :

L'identification de gènes codants pour des AT a permis l'élaboration de vaccins anti-tumoraux s'appuyant sur l'utilisation de plasmides et de vecteurs viraux recombinants. Ces vecteurs agissent comme des transporteurs d'AT afin de faire exprimer ces derniers dans les cellules de l'hôte. Ainsi, suite à l'administration de ce type de vaccin, les DC se trouvant au site d'injection peuvent, suite à l'incorporation du vecteur, exprimer l'AT et présenter des peptides par CMH-I et -II pour activer les lymphocytes T.

Ce type de traitement consiste en la modification génétique d'une cellule à des fins thérapeutiques et permet de manipuler le système immunitaire de l'hôte afin de créer une réponse dirigée contre les cellules tumorales [166]. Un des avantages de à l'utilisation de ces vecteurs (plasmides ou viraux) est qu'il est possible de les manipuler, par l'addition ou la soustraction de certains motifs, pour faire en sorte que les AT soient livrés spécifiquement dans un type de cellules ou évitent spécifiquement un autre type [167]. Comme la vaccination peptidique, ce type de vaccination permet une production rapide et diversifiée, selon les AT disponibles pour les cancers ciblés.

*Transfert adoptif de lymphocytes (ACT).*

Cette méthode consiste à extraire les lymphocytes infiltrant de la tumeur d'un patient, les expandre *ex vivo* pour atteindre des quantités de l'ordre de  $1 \times 10^{11}$  cellules [168] et enfin les re-transfusés au patient. Des essais cliniques de transfert adoptif ont entraîné des régressions tumorales dans une proportion allant jusqu'à 34% des patients atteints d'un mélanome métastatique [149]. Il a été montré que la lymphodéplétion du patient précédant le transfert adoptif améliore considérablement l'efficacité du traitement [169, 170]. L'irradiation totale du corps ou l'administration d'agents chimiothérapeutiques lymphodéplétants non myéloablatifs agissent en réduisant les Treg, ce qui résulte non pas en une augmentation du nombre de

lymphocytes T réactifs à la tumeur, mais plutôt à une augmentation des fonctions effectrices des cellules transférées [171].

Plus récemment, d'autres formes d'ACT utilisant des T génétiquement modifiés ont été développés et testés en clinique. Ceux-ci incluent les T expandus à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) qui expriment des TCR  $\alpha\beta$  recombinants reconnaissant des épitopes associés aux antigènes tumoraux [172, 173] ou exprimant des récepteurs antigéniques chimériques (CAR) composés de régions d'immunoglobulines variables reconnaissant des antigènes tumoraux, fusionnées aux domaines signalisants de la chaîne  $\zeta$  du CD3 et de molécules de costimulation comme CD28 et CD137/4-1BB [174, 175]. Le nombre de recherche sur les thérapies ciblant les lymphocytes T autologues dans le mélanome s'est drastiquement accrue au courant de la dernière décennie, avec la découverte de nouveaux antigènes cibles et une augmentation du nombre d'essais cliniques associés aux TIL et aux lymphocytes T TCR-transgéniques, ou chimériques.

### **1.3 Les molécules responsables du recrutement des cellules immunitaires dans les tumeurs.**

L'établissement d'une réponse anti-tumorale va mettre en jeu des mécanismes qui vont permettre la migration des cellules immunes et de la guider vers les différents sites (sang, tumeur, ganglions, TLS...), mais aussi au sein d'un même site. Les facteurs intervenant lors de ces mécanismes peuvent être associés aux tumeurs ou aux cellules immunitaires et vont évoluer au cours de la progression et du traitement de la maladie. Identifier ces facteurs et comprendre ces mécanismes par lesquels le contexte immunitaire se met en place est essentiel afin de guider des thérapies du cancer innovantes.

Parmi les facteurs influençant la biodistribution des cellules dans le corps, on retrouve :

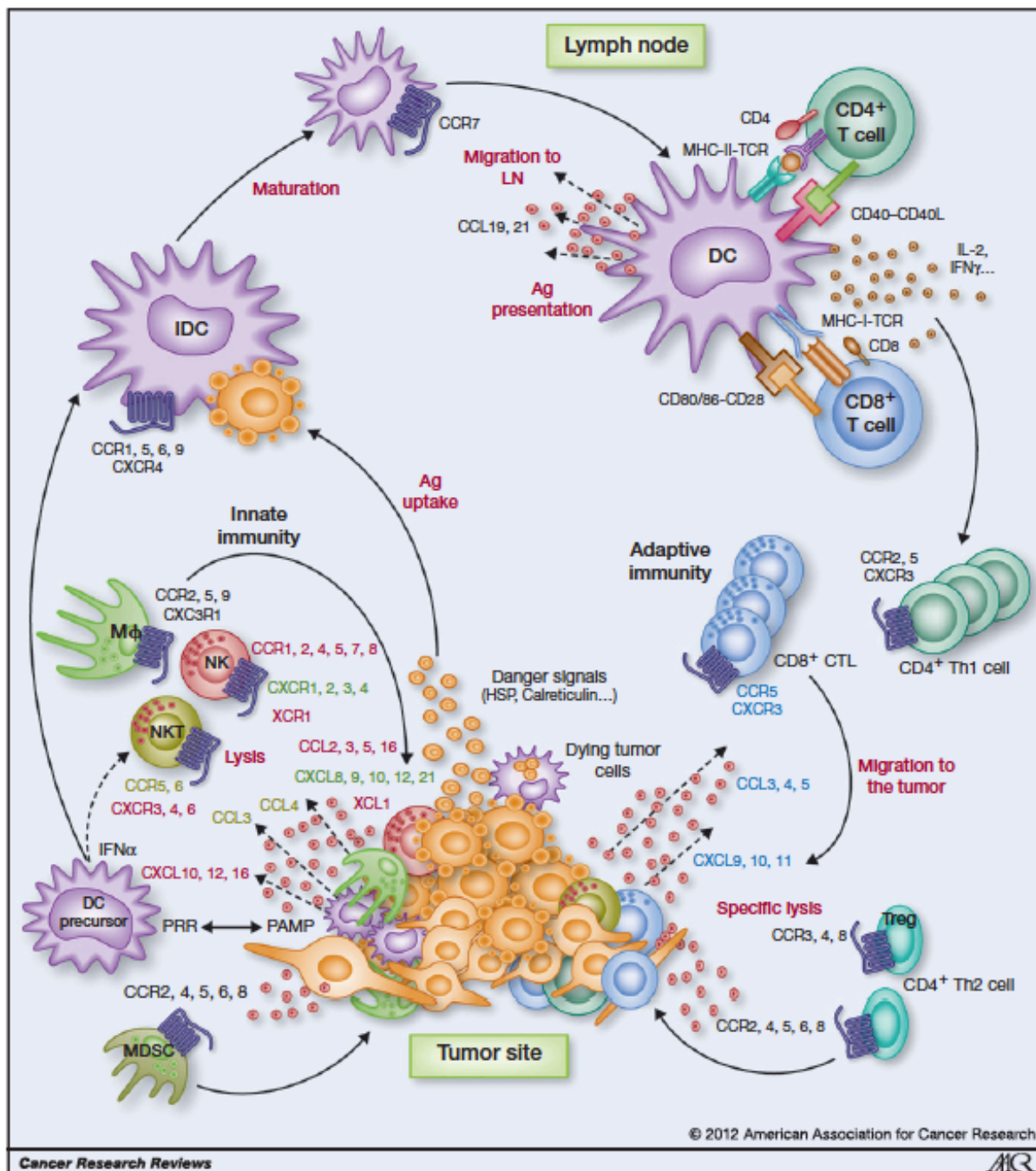
#### **1.3.1 Les chimiokines.**

Les cytokines et particulièrement les chimiokines ont été à l'origine caractérisées pour leur capacité à induire la chimioattraction des leucocytes. Elles sont aussi reconnues pour orchestrer leur polarisation, leur développement, leur activation et leur immunocompétence, qui sont cruciales à l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale [176-178].

### *1.3.1.1 Généralités*

Les chimiokines sont des petites protéines (8-14 kDa) sécrétées. Il existe plus de 50 membres répartis en 4 familles : CC, CXC, CX3C et les C [176]. Elles interagissent avec une vingtaine de récepteurs qui possèdent 7 domaines transmembranaires et qui sont couplés aux protéines G (GPCR).

Les chimiokines sont donc responsables de l'élaboration du microenvironnement tumoral et de la composition qualitative et quantitative des TIIC. D'une part, les chimiokines sont responsables du recrutement des cellules immunitaires qui génèrent et orchestrent la réponse antitumorale. Certaines vont même être responsables de la formation des TLS [143]. D'autre part, les chimiokines maintiennent la survie de la tumeur, sa progression et sa capacité métastatique [177] (**Figure 6**).



**Figure 6 : Cellules et chimiokines qui coordonnent le microenvironnement tumoral (extrait de [178]).**

Les chimiokines directement sécrétées par les cellules cancéreuses ou par les autres cellules constituant le microenvironnement tumoral (stromales, immunitaires) agissant sur le recrutement, la polarisation, l'activation des cellules immunes adaptatives et innées. Ces cellules supportent ou contrôlent le développement de la tumeur.

Les chimiokines et leurs récepteurs représentent un grand intérêt pour optimiser les réponses immunitaires antitumorales afin de les utiliser comme cibles pharmacologiques à des fins thérapeutiques.

Dans le cas de traitement des patients par immunothérapie utilisant le transfert adoptif de cellules T, une partie des patients ne répondent pas aux traitements, alors que la majorité des cellules transférées sont des lymphocytes T qui montre une activité spécifique antitumorale. D'autres études montrent que moins de 1% des cellules transférées migrent à la tumeur. Les stratégies visant à renforcer la migration des lymphocytes T au site tumoral sont susceptibles d'améliorer l'efficacité de ce type d'immunothérapie. Il est donc essentiel de bien comprendre les voies impliquées dans la médiation de chimiokines pour le recrutement des cellules effectrices au site tumoral et dans la régulation de leurs fonctions. Plusieurs stratégies peuvent être appliquées :

#### *Induction de chimiokines par les tumeurs*

Plusieurs approches ont été utilisées afin d'augmenter l'expression de chimiokines spécifiques dans le microenvironnement tumoral.

Par exemple, des essais cliniques de phase I réalisés au Moffitt Cancer Center en Floride et à l'Université de Los Angeles en Californie sont basés sur l'administration intratumorale de CCL21 par des DC transduites par des adénovirus [179].

#### *Induction de récepteurs de chimiokines.*

Afin d'accroître de manière sélective le nombre de CTL spécifiques dans le microenvironnement tumoral, il est possible de transduire ces cellules avec des récepteurs spécifiques de chimiokines produite par les tumeurs.

Par exemple, les mélanomes montrent des niveaux élevés d'infiltration de monocytes/macrophages, induits par l'axe CXCR2-CXCL1 et/ou CXCL8. Ainsi, l'introduction du gène de CXCR2 dans des cellules T spécifiques permet d'améliorer leur réponse antitumorale [180].

### *Blocage des chimiokines ou des récepteurs de chimiokines.*

Cette stratégie peut être utile afin de limiter la progression des tumeurs. Par exemple, le récepteur CXCR4 est le plus exprimé dans les cellules tumorales et est responsable du phénomène de métastase dans de nombreux cancers [181]. Des stratégies de blocage de l'axe de CXCR4-CXCL12 sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques sur des patients souffrant de cancer de l'ovaire, de sarcome ostéogénique et de leucémie myéloïde aiguë (ClinicalTrials. identifiant gov:NCT01120457).

Des études, chez la souris, montrent que l'administration d'anticorps monoclonaux bloquant CCL2 réduisant le recrutement de monocytes à l'origine du phénomène de métastase dans un modèle de cancer de sein [182].

### *Ciblage des modifications post-traductionnelles des chimiokines.*

L'environnement tumoral est composé de facteurs qui peuvent avoir un effet sur l'activité des chimiokines. C'est le cas, par exemple, des RNS qui induisent la nitration du CCL2 dans différents cancers humains et murins. En conséquence, le CCL2 modifié ne peut plus attirer les CTL spécifiques à la tumeur. Ce mécanisme d'échappement tumoral peut être ciblé sur le plan pharmacologique par l'administration *in vivo* d'un nouveau médicament (l'AT38) qui bloque la production intratumorale RNS [183].

Afin de permettre la mobilité des cellules immunes, ces chimiokines vont induire l'activation de l'expression de molécules d'adhérences (CAM : *cell adhesion molecule*).

## **1.3.2 Les molécules d'adhérence.**

### *1.3.2.1 Généralités.*

Les CAM sont des protéines exprimées à la surface des cellules leur permettant d'adhérer à d'autres cellules ou à la matrice extracellulaire. On retrouve quatre groupes majeurs : les cadhérines, les intégrines, les sélectines et les membres de la superfamille des immunoglobulines (Ig-CAM).

### *Les sélectines.*

Les sélectines appartiennent à la famille des léctines de type C. Il existe trois membres qui sont récepteurs transmembranaires à chaîne unique : la E-(endothélial, CD62E), la P-(plaquettes, CD62P) et la L-(leucocyte, CD62L) sélectine [184].

La L-sélectine est exprimée de façon constitutive sur la plupart des leucocytes alors que la E- et la P-sélectine sont exprimées à la surface des cellules endothéliales inflammées [185]. Elles se lient à la *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL1) et à d'autres ligands glycosylés [186]. La E-selectine peut aussi lier CD44 glycosylé ou au ligand 1 de la E-sélectine (ESL1).

### *Les intégrines.*

Il existe 24 hétérodimères qui se lient à une grande variété de protéines de la matrice extracellulaire et de la surface cellulaire. Les leucocytes expriment l'intégrine  $\alpha 4$  (CD49d),  $\alpha 4\beta 1$  (VLA4-*very late antigen 4*),  $\alpha 4\beta 7$  (LPAM),  $\alpha L\beta 2$  (LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen 1*, CD11a) et le  $\alpha M\beta 2$  (Mac-1, *macrophage antigen 1*, CD11b).

Elles peuvent créer des liaisons hétérotypiques avec des protéines de la matrice extracellulaire (la fibronectine, le fibrogène, la vitronectine, la lamine ou le collagène).

### *La superfamille des Immunoglobulines.*

Elle forme un large groupe de glycoprotéines de surface qui contiennent un domaine extracellulaire semblable aux immunoglobulines. Ces molécules sont capables de réaliser des liaisons homotypiques et hétérotypiques indépendamment du calcium. Cette grande famille se compose entre autres des *vascular cell adhesion molecules* (VCAM), des *intercellular cell adhesion molecules* (ICAM), des *platelet-endothelial cell adhesion molecules* (PECAM).

### *Les cadhérines.*

Les cadhérines sont constituées d'une simple chaîne glycoprotéique permettant de réaliser des interactions homotypiques dépendantes du calcium. La superfamille des cadhérines compte les cadhérines dites « classiques », comprend principalement les E-(épithéliales), N-(neurales) et les P-(placentaires) cadhérines. Cette superfamille contient également les cadhérines non-classiques incluant les cadhérines desmosomales et les proto-

cadhérines. Les cadhérines classiques sont les plus étudiées. Dans la cellule, elles sont associées au complexe des caténines  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ - et à la protéine p120.

### *1.3.2.2 Implication des molécules d'adhérence dans le recrutement des leucocytes.*

L'expression de CAM à la surface d'une cellule peut avoir deux rôles contradictoires, soit de liaison et de mobilité. En effet, c'est en se liant à d'autres protéines que les leucocytes vont se déplacer vers les sites d'inflammation.

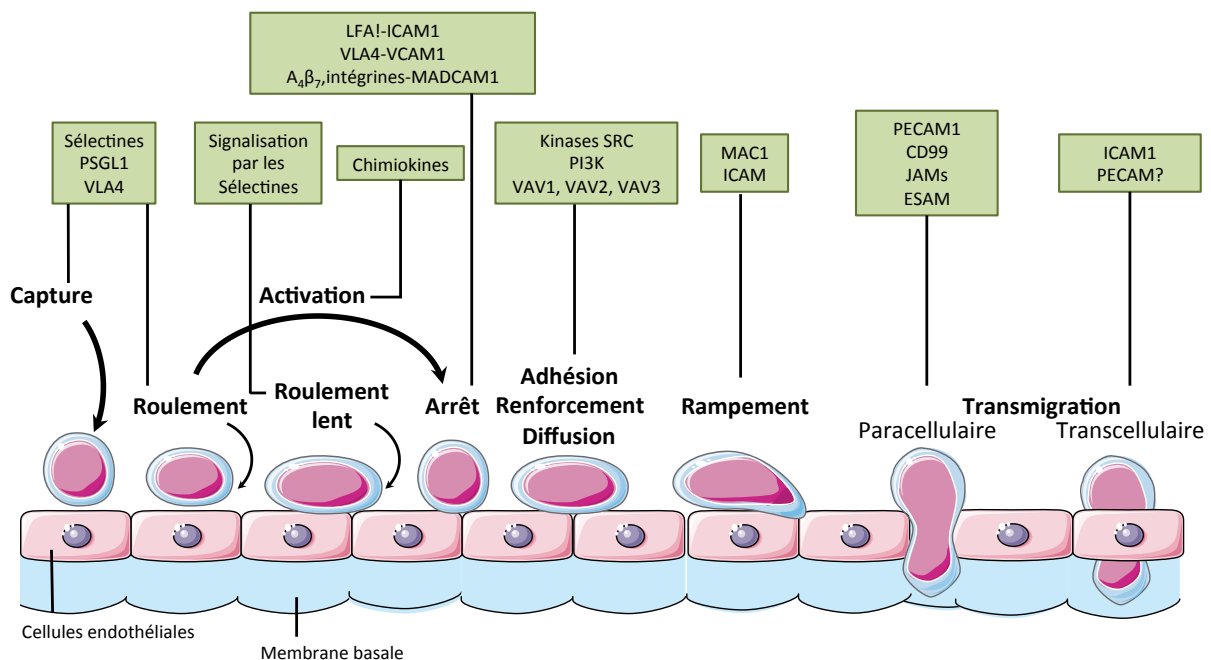
Cette partie résume le processus de recrutement des leucocytes à partir du système vasculaire à un tissu tumoral inflammé afin de mettre en évidence l'importance de la collaboration entre les chimiokines et les CAM. Ce processus se déroule en plusieurs étapes complexes étroitement régulées qui sont en général assez similaires pour les différentes sous-populations leucocytaires [187, 188] (**Figure 7**).

Dans un premier temps, les leucocytes sont recrutés dans les veinules post-capillaires où le flux sanguin est faible. Ceci est suivi par le roulement de la cellule immune le long de l'endothélium des vaisseaux sanguins. Cette étape est médiée par des interactions impliquant les sélectines et le PSGL1 exprimé par les cellules endothéliales et les leucocytes [189, 190]. Dès que des liaisons de forte affinité des sélectines sont rompues, de nouvelles se forment constamment [191] provoquant ainsi une force de cisaillement qui va entraîner le mouvement de roulement de la cellule sur l'endothélium [192]. Lors du roulement lent, les leucocytes vont être sensibles aux signaux d'activation (chimiokines, interleukines) libérés par l'endothélium inflammé ou par des macrophages locaux [193]. L'activation de leurs GPCR va induire des cascades de signalisation intracellulaires conduisant à l'activation de l'expression des intégrines (particulièrement LFA1 et VLA-4). Très rapidement, celles-ci vont se lier aux Ig-CAM telles que VCAM1 et ICAM1 exprimées à la surface des cellules endothéliales inflammées [194], provoquant ainsi l'arrêt de la cellule [195, 196]. Certaines signalisations par les intégrines induisent la réorganisation du cytosquelette cellulaire favorisant l'étalement cellulaire et la transmigration. Cette transmigration des leucocytes va se faire principalement par une voie para-cellulaire où les cellules immunes vont traverser entre les cellules endothéliales. L'interaction des intégrines avec les cellules endothéliales va induire des mécanismes qui vont favoriser la migration des leucocytes [197, 198]. Par exemple, des



molécules présentes dans les jonctions entre les cellules endothéliales (PECAM ou la molécule d'adhérence de jonction A (JAM-A)) auxquelles les leucocytes peuvent se lier vont être exprimées du côté de la lumière de l'endothélium de manière à guider les leucocytes vers les jonctions cellulaires [199]. Par la suite, les leucocytes vont passer entre les cellules endothéliales en créant des liaisons avec PECAM1, JAMs, CD99, ICAM-1 et ICAM-2. Alternativement, les leucocytes peuvent extravaser par la voie transcellulaire. La liaison du leucocyte à ICAM1 sur la cellule endothéliale va conduire au recrutement de vésicules qui vont former des organites vésiculo-vacuolaires (VVO) et contribuer à former des pores dans la cellule endothéliale par lesquels les cellules immunes peuvent traverser via des interactions avec PECAM1 [200].

Une fois l'endothélium traversé, les cellules doivent migrer à travers la membrane basale constituée de molécules telles que les collagènes IV ou les laminines. Dans ce cas les cellules immunes vont mettre en place d'autres types de liaisons et vont produire des protéases pour atteindre leur site d'action.



**Figure 7 : Cascade d'adhérence des leucocytes (adapté de [187]).**

Les étapes de la cascade d'adhérence comprennent : la capture du leucocyte, son roulement sur l'endothélium qui le ralentit, son arrêt par l'adhérence, l'exploration

intravasculaire, et la transmigration par des voies paracellulaire et transcellulaire. Les molécules clés impliquées dans chaque étape sont indiquées dans les cases.

## **1.4 La molécule d'adhérence CD146.**

Comme d'autres molécules d'adhérences, la CAM CD146 est surexprimées par les cellules immunes situées dans les zones d'inflammation [201, 202]. Quelques études récentes ont décrit l'expression de cette molécule et son rôle dans les maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque [203, 204], mais aucune littérature ne décrit CD146 dans les cellules immunes infiltrant les tumeurs.

### **1.4.1 Description.**

#### *1.4.1.1 Nomenclature et structure.*

CD146 est une CAM aussi désignée comme *melanoma cell adhesion molecule* (MCAM ou Mel-CAM) [205, 206], MUC18 [207], l'antigène A32 [208], S-Endo-1[209], *metastasis cell adhesion molecule* (MET-CAM) [210] et *hemopoietic cell adhesion molecule* (HEMCAM) [211]. Elle possède une seule copie de gène localisé sur le bras long du chromosome 11 chez l'humain [212].

C'est une glycoprotéine membranaire qui appartient à la superfamille des Ig-CAM indépendantes du calcium [207]. Sa structure protéique de 113 kDa est caractérisée par deux régions variables (V) et trois régions constantes (C2) : V-V-C2-C2-C2, formant un fragment extracellulaire, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique [207, 213]. Des protéines homologues avec des séquences identiques ont été retrouvées chez la souris, le rat, le poulet et le poisson-zèbre (revue en [214]). On retrouve deux isoformes de CD146 nommées MCAM long (MCAM-l) et MCAM court (MCAM-s) qui possèdent des propriétés d'adhérence similaire, mais qui diffèrent dans leur domaine cytoplasmique. Chez l'humain, seule l'isoforme MCAM-l est retrouvée [215, 216].

Il existe une forme soluble de CD146 (sCD146) qui a été identifiée chez l'humain [217, 218]. On la retrouve dans le surnageant de culture de cellules endothéliales et dans le plasma de sujets sains. Elle serait générée à partir du clivage de CD146 membranaire, mais cette origine reste controversée [201, 218].

#### 1.4.1.2 Expression et régulation de CD146.

L'expression de CD146 a été mise en évidence dans les tissus en développement. Ainsi une étude réalisée chez l'humain montre l'expression de CD146 dans certaines cellules d'un embryon entre 7 et 12 semaines de gestation (les cellules endothéliales, les cellules de Schwann, les cellules musculaires lisses, les ganglions, les cellules gliales du système nerveux central en développement, les cellules du muscle squelettique). Cette expression est perdue dans certaines cellules après 16 semaines de gestation [219].

Chez l'adulte, on retrouve son expression dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules de Schwann, les ganglions, les myofibroblastes, le cortex cérébelleux, au site d'implantation trophoblaste intermédiaire, dans la gaine épithéliale externe des follicules pileux, les cellules mammaires canalaire, l'épithélium sous-capsulaire du thymus, dans les cellules dendritiques réticulaires, les fibroblastes, les cellules basales de l'épithélium bronchique, dans la glande parathyroïde, et dans des populations de cellules immunes (revue en [220] et en [214]).

Les premières études de CD146 dans le cancer ont montré que cette CAM était plus fortement exprimée par les mélanomes que par les mélanocytes normaux (d'où sa nomenclature MCAM) [205]. Par la suite, il a été montré que cette surexpression était aussi retrouvée dans de nombreuses autres tumeurs primaires et métastatiques (revue en [214]).

Bien que les mécanismes régulant l'expression de CD146 restent mal connus, ils semblent être différents dans les cellules de l'embryon, de l'adulte et dans les cellules tumorales. Dans les cellules tumorales, l'origine de cette surexpression ne serait pas due à des mutations, des translocations ou des amplifications du gène codant pour CD146 [221]. Une étude publiée par Liu *et al.* dans le cancer de la prostate montre que la surexpression de CD146 serait causée par une hyperméthylation du promoteur du gène de CD146 et que le taux de méthylation du promoteur serait corrélé avec le grade des carcinomes primaires de la prostate [222].

Il est aussi possible d'induire l'expression de CD146 dans les cellules par des signaux environnementaux tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-1a [223, 224], l'IL-13 [225]), des facteurs de croissance (l'endothéline-1 [226], le TFG- $\beta$  [227], le facteur de

croissance du tissu nerveux (NGF) [228]) ou la pression osmotique (un taux élevé de glucose [229], une concentration élevée de  $\text{Ca}^{2+}$  [230] et une augmentation de AMPc [231]).

Dans les lymphocytes T l'expression de CD146 peut être induite suite à une activation des cellules à la phytohaémagglutinine (PHA) ou par une stimulation du CD3 [232]. L'activation des cellules B par le CD40 ligand (CD40L) et l'IL-4 induit aussi CD146 [233].

#### **1.4.2 Rôle de CD146.**

CD146 est capable de se lier avec elle même pour réaliser des liaisons homotypiques ou avec d'autres protéines par des liaisons hétérotypiques. Cette capacité va lui apporter de nombreuses propriétés qui ont fait l'objet de nombreuses études dans la dernière décennie. Elle a, à la fois, un rôle de ligand et de récepteur.

##### *1.4.2.1 L'adhérence médiée par CD146.*

Même si la force d'adhérence de CD146 est plus faible que celle d'autres CAM telles que les sélectines, les intégrines ou les autres protéines de la famille des Ig-CAM (ICAM, VCAM-1 et PECAM), CD146 possède de nombreuses propriétés d'adhésion.

Elle joue un rôle important dans la cohésion tissulaire et a été identifiée dans les jonctions entre les cellules endothéliales favorisant ainsi le contact cellule-cellule [217, 224].

Des études *in vitro* réalisées avec des lignées cellulaires de mélanome montrent l'importance de la liaison hétérotypique de CD146 pour leur adhérence à la matrice extracellulaire [234, 235].

CD146 est exprimée dans l'utérus maternel réceptif et dans le trophoblaste embryonnaire envahissant au cours des premiers stades de la grossesse, mais elle est totalement absente dans l'utérus non gravide. L'activité d'adhérence de CD146 peut être variée au cours des différentes étapes du développement et est nécessaire pour certains processus physiologiques spécifiques, tels que l'implantation de l'embryon et l'invasion trophoblastique [236, 237].

##### *1.4.2.2 Rôle de CD146 dans le développement.*

En comparant l'expression de CD146 dans les tissus embryonnaires et les tissus matures, il a été montré que des niveaux élevés de CD146 sont exprimés dans l'épithélium des

systèmes nerveux [228], de la trachée [238], du rein [239] et les trompes utérines [240] des embryons et que ces niveaux d'expression diminuent de manière spectaculaire après maturation [241]. Ce qui montre que CD146 joue un rôle dans l'organogenèse et donc le développement embryonnaire.

CD146 est considérée comme un marqueur de cellules souches mésenchymateuses (MSC). Isolées à partir de plusieurs organes adultes et fœtaux, les MSC montrent des niveaux d'expression très élevés de CD146 [242, 243].

#### *1.4.2.3 Implication de CD146 dans la migration et l'invasion cellulaire.*

CD146 n'a pas seulement une fonction de molécule adhérence, elle est aussi impliquée dans des voies de signalisation aboutissant à la migration et l'invasion des cellules normales ou tumorales.

Par exemple, la signalisation initiée par CD146 permet d'induire la phosphorylation de Fyn (une kinase de la famille de Src), qui va ensuite transférer un phosphate à la kinase de PKC- $\gamma$  permettant le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules. Ceci permet l'association des protéines P130, Pyk2 et paxilline, et d'activer p125 (FAK) qui polarise et réarrange le cytosquelette d'actine (**Figure 8 A**) [244, 245].

En bloquant l'expression d'ATF-3 qui est un inhibiteur de la transcription de l'oncogène Id-1, CD146 serait impliquée dans l'expression de ce dernier [246]. La surrégulation d'Id-1 induirait l'expression de matrice métalloprotéinase 2 (MMP2) favorisant la migration des cellules (**Figure 8 D**).

Récemment, une étude réalisée chez le poisson-zébre implique Wnt5a se liant à CD146 avec une forte affinité induisant l'activation de *Dishevelled* (Dvl) et *c-jun amino-terminal kinase* (JNK) impliquée dans la migration des cellules [247] (**Figure 8 C**).

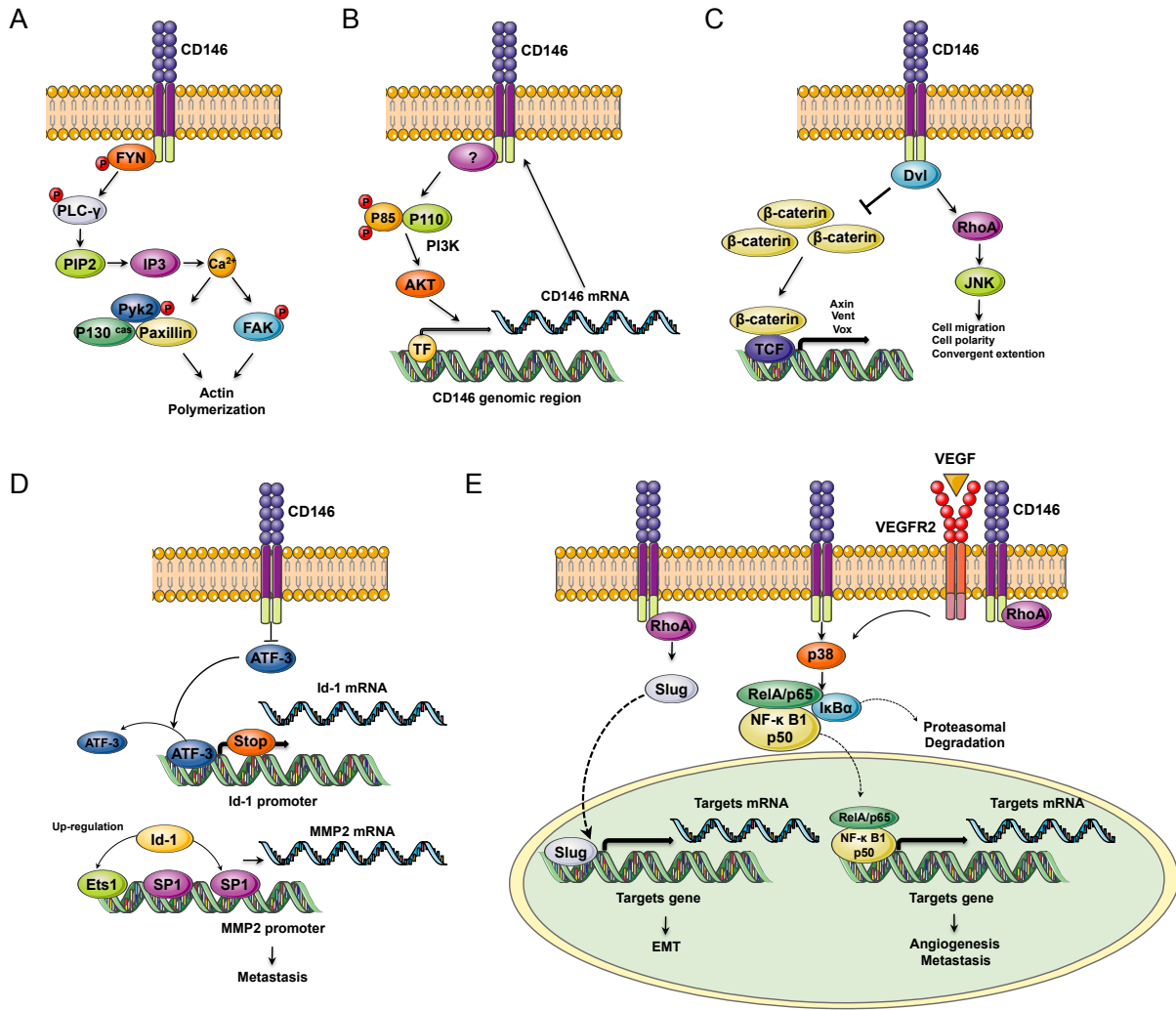
#### *1.4.2.4 Implication de CD146 dans la prolifération et la survie des cellules.*

Dans les mélanomes, l'expression de CD146 est régulée par la voie PI3K/AKT. Une surexpression de CD146 va activer la voie PI3K/AKT dont la phosphorylation va elle même induire l'expression de CD146 (**Figure 8 B**). Le mécanisme exact de cette voie reste à élucider, mais cette signalisation par l'axe CD146/PI3K/AKT permettrait de comprendre

comment les cellules du mélanome échappent à l'apoptose et augmentent leur capacité de survie [248].

#### 1.4.2.5 *CD146 favorise l'angiogenèse.*

Utilisant le modèle d'embryogenèse du poisson-zèbre, CD146 a été identifiée comme jouant un rôle crucial dans le développement du réseau vasculaire [249]. L'angiogenèse est également nécessaire à la propagation d'une tumeur et donc au phénomène de métastase. En 1994, Sers et son équipe ont rapporté que CD146 est très fortement exprimée dans l'endothélium des vaisseaux sanguins de la tumeur, et que sa surexpression est associée à l'angiogenèse tumorale [250]. CD146 est ensuite considérée comme une cible de l'angiogenèse tumorale [251]. Cette protéine en collaboration avec l'activation du récepteur 2 du *Vascular endothelial growth factor* du (VEGFR-2) par le VEGF, induit l'angiogenèse en augmentant la voie de signalisation VEGFR/NFκB (**Figure 8 E**) [252]. Ce qui fournit une preuve de l'implication de la voie CD146/NFκB dans le phénomène de métastase des cellules cancéreuses [253].



**Figure 8 : Voies de signalisations induites par CD146 (adapté de [214]).**

(A) CD146 induit la phosphorylation de la kinase p125 dans les cellules endothéliales chez l'humain. (B) Co-régulation de CD146 et AKT dans les mélanomes chez l'humain (C) CD146 se lie avec une forte affinité à Wnt 5 activant la cascade de signalisation via Wnt/Dvl/JNK induisant ainsi le réarrangement du cytosquelette d'actine et la migration de la cellule.

(D) Régulation de l'expression Id-1 par CD146. (E) CD146 active le facteur de transcription de NFκB par l'activation de la kinase P38. CD146 dans les cellules immunitaires

### 1.4.3 CD146 dans les cellules immunitaires.

#### 1.4.3.1 Description.

Des analyses en cytométrie de flux du sang périphérique de donneur sain humain ont montré que la molécule d'adhérence CD146 est exprimée par les leucocytes [232, 233]. Il y a une dizaine d'années, Elsahl et son équipe ont caractérisé cette infiltration [254]. Ils ont montré que cette expression est limitée à une faible proportion de cellules immunes (moins de 1% des cellules mononuclées CD45<sup>+</sup>) et qu'elle est exprimée majoritairement par les lymphocytes T (2-3 % des cellules CD3<sup>+</sup>). Les lymphocytes T exprimant CD146 (CD3<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup>) sont majoritairement des CD4<sup>+</sup> avec un profil de cellules mémoires effectrices CD45RO<sup>+</sup> et sont CCR7<sup>-</sup> avec un profil génique pro-inflammatoire [204, 254]. L'expression de CD146 dans ces cellules est stable dans le temps [204]. L'analyse du profil en ARN des cellules CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> montre des niveaux élevés de gènes associés aux cellules Th17 (IL-17A, ROR- $\gamma$ , IL-22, IL-26, IL-23R, CXCL-13, IL1- $\beta$ , *macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF)), mais elles ont des niveaux similaires aux CD4<sup>+</sup>CD146<sup>-</sup> de gènes liés aux Th1 (IFN- $\gamma$ ) [204, 255-257]. Ce profil génique a été confirmé par leur expression protéique élevée de récepteurs de chimiokines (CD161, CCR6, CCR4, CXCR-3) et leur production des cytokines IL-17A, IL-22, GM-CSF, associés au profil Th17.

Chez la souris, CD146 a été identifiée dans des populations de cellules NK [258] matures et de cellules B [259].

Comme précisée précédemment, l'expression de CD146 peut être induite lors de l'activation des cellules immunes [232, 233]. On trouve également une plus forte proportion de lymphocytes exprimant CD146 dans des conditions d'inflammation. C'est le cas pour les lymphocytes infiltrant le liquide synovial de personnes souffrant d'arthrite rhumatoïde [202, 232] ou d'autres maladies inflammatoires [202]. On retrouve aussi cette augmentation de proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant CD146 dans le sang de patients ayant une maladie inflammatoire telles que le syndrome de Behçet, la maladie de Crohn, la sarcoïdose [255], le psoriasis [257], la sclérose en plaques [203, 204]. Comme chez les donneurs sains, les CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> du sang de patients avec ces maladies inflammatoires ont un profil de lymphocytes Th17. C'est le cas aussi pour les lymphocytes retrouvés dans le liquide céphalorachidien des patients atteint de sclérose en plaques [203, 204, 255].



### 1.4.3.2 Rôle de CD146 dans l'adhérence et la migration des lymphocytes.

Dans un premier temps, des essais d'adhérence *in vitro* ont montré que les CD3<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> possèdent une meilleure capacité d'adhérence que les CD3<sup>+</sup> CD146<sup>-</sup> aux cellules HUVECs [254]. CD146 serait impliquée dans le roulement, l'adhérence et la migration des lymphocytes à travers l'endothélium [216].

Par la suite, la capacité d'adhérence de CD146 dans les cellules immunes est réalisée de façon homotypique [259] et/ou hétérotypique [218]. Récemment, le groupe de Flanagan a identifié le ligand de CD146 en générant une protéine de fusion (MCAM-Fc) afin d'examiner son interaction avec les tissus. Que ce soit chez la souris ou chez l'homme, MCAM-Fc se lie de façon spécifique à la laminine 411 un isoforme de la laminine exprimé par l'endothélium vasculaire. La laminine 411 avait été, par ailleurs, précédemment impliquée dans la migration des cellules T murines à travers le système nerveux central [260, 261].

Il a d'ailleurs été montré que CD146 intervient dans l'adhésion des Th17 à l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique chez l'humain [203, 204]. Le groupe de recherche de Prat et Larochelle a même montré par des études *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de sclérose en plaques (encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)), l'implication de CD146 dans la migration des lymphocytes T à travers les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Le blocage de CD146 par un anticorps réduit l'infiltration des Th17 et apporte une protection thérapeutique envers la maladie [204].

## Raisonnement et hypothèse

Compte-tenu des travaux antérieurs qui impliquent la molécule d'adhérence CD146 dans la migration des cellules immunes aux sites d'inflammation [204], nous pensons que cette CAM pourrait intervenir dans le processus d'infiltration des cellules immunes au sein de la tumeur et dans la migration des cellules au sein de la tumeur. Sachant que la tumeur met en place divers mécanismes afin de moduler l'activité des cellules effectrices, nous suggérons que celles-ci pourraient orienter le phénotype des cellules immunes grâce à l'induction de CD146.

Les cellules immunes exprimant CD146 dans les tumeurs pourraient présenter un phénotype qui leur est propre et exploiter cette molécule d'adhérence afin d'augmenter leur capacité de migrer vers la tumeur.

## **Objectif du projet de doctorat**

Nous proposons deux objectifs à ce projet :

1- Identifier la méthode de désagrégation causant le moins d'altérations de la biologie des TIIC.

2- Évaluer et caractériser l'expression de la molécule d'adhérence CD146 dans les TIIC de tumeurs de rein, de sein et de poumons et d'étudier son origine.

## **2<sup>ème</sup> Section : Manuscrit I**

Phenotypic characterization and functional analysis of human tumorimmune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation.

Article publié dans *Journal of Immunological Methods* le 30 septembre 2011 volume 372 pages 119-126 PMID: 21782822.

## Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation

Cécile Grange<sup>a</sup>, Jason Létourneau<sup>a</sup>, Marie-Andrée Forget<sup>a</sup>, Jessica Godin-Ethier<sup>a</sup>, Jocelyne Martin<sup>b</sup>, Moïshe Liberman<sup>b</sup>, Mathieu Latour<sup>c</sup>, Hugues Widmer<sup>d</sup>, Jean-Baptiste Lattouf<sup>a,d</sup>, Ciriaco A. Piccirillo<sup>e</sup>, Jean-François Cailhier<sup>a</sup>, Réjean Lapointe<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

<sup>b</sup> Department of Surgery, Université de Montréal, Division of Thoracic Surgery, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Québec, Canada H2L 4M1

<sup>c</sup> Department of Pathology, CHUM, Montréal, Québec, Canada H2X 3J4

<sup>d</sup> Department of Urology, CHUM, Montréal, Québec, Canada H2X 3J4

<sup>e</sup> Departments of Microbiology&Immunology and Medicine, McGill University and Research Institute of the McGill University Health Center, Montréal, Québec, Canada H3G 1A4

### Contribution des auteurs:

*C. Grange est responsable de la majorité de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article en collaboration avec R. Lapointe et J-F. Cailhier. J. Létourneau, M-A. Forget et J. Godin-Ethier ont apporté une contribution technique et critique. J. Martin, M. Liberman, M. Latour, H. Widmer, J-B Lattouf ont contribué à l'obtention des échantillons cliniques utilisés pour les travaux de recherche. C.A. Piccirillo a apporté réflexion critique et intellectuelle. R. Lapointe et J-F. Cailhier ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

**Key words:** Tumor infiltrating immune cells, homogenization, collagenase, Medimachine™

### Abbreviation:

Mab: Monoclonal antibodies

MFI: Mean fluorescence intensity

NK: Natural killer

MDSC: Myeloid-derived suppressor cells

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

PBS: Phosphate buffered saline

TIIC: Tumor infiltrating immune cells

TIL: Tumor infiltrating lymphocytes

## **Abstract**

Multi-parametric flow cytometry analysis is a reliable method for phenotypic and functional characterization of tumor infiltrating immune cells (TIIC). The isolation of infiltrating leukocytes from solid tumors can be achieved by various techniques, which can be either enzymatic or mechanical; however, these methods might alter cell biology. The aim of this study was to compare the effects of three tissue disaggregation methods on TIIC biology from breast, kidney and lung tumor specimens. We therefore compared two enzymatic treatments, either collagenase type IA alone or a combination of collagenases types IA, IV and DNase I type II, and one mechanical system (Medimachine™). We evaluated effects of each treatment on cell viability, surface marker expression and proliferative capacity. We first show that cell viability is not affected by any of the tissue treatments. However, enzymatic treatments decreased cell proliferation, and specifically treatments with enzymatic cocktails (Collagenases + DNase) provoked a significant loss of surface markers such as CD4, CD8, CD45RA and CD14, indicating that results of phenotypic studies obtained by enzymatic isolation techniques could be altered. In conclusion, mechanical tissue disaggregation by Medimachine™ appears to be an optimal disaggregation method to maintain phenotypic and functional TIIC features.

## Introduction

Solid tumors are frequently infiltrated by immune cells such as T and B lymphocytes, natural killer (NK) cells, NK-T cells, macrophages, neutrophils, mast cells, dendritic cells, myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and eosinophils (de Visser *et al.*, 2006; Grivennikov *et al.*, 2010). These cells contribute either positively or negatively to the tumor outcome depending on their numbers, heterogeneity, maturation level and localization (Galon *et al.*, 2006; Talmadge *et al.*, 2007; Pages *et al.*, 2010). The phenotypic and functional characterization of the immune cells within a tumor enables us to understand the cross talk occurring between the immune cells and tumor cells *per se*. Such characterization may also serve as a prognostic marker depending on the type of cells present in the tumor environment. Multi-parametric flow cytometry analysis is a powerful method to perform a comprehensive characterization of immune cells by the evaluation of the co-expression of several surface or intra-cellular proteins (Moloney and Shreffler, 2008). This approach is easily applied on cells in suspension. However, its utilization for the characterization of tumor infiltrating immune cells (TIIC) requires the extraction of the immune cells from solid tumor masses. The first tumor disaggregation protocols to obtain viable cell suspensions were described in the late 1970's (Hamburger and Salmon, 1977; Salmon *et al.*, 1978; Rasey and Nelson, 1980); since, a plethora have been described (Cerra *et al.*, 1990; Cunningham, 2010). These protocols usually involve mechanical or enzymatic disaggregation, either alone or in combination. Enzymatic digestion commonly involves collagenase, hyaluronidase, dispase, trypsin or DNase. Mechanical methods of tissue dissociation are based on aspiration, vortexing, scraping or tissue pressing (Cornacchiari *et al.*, 1995; Ottesen *et al.*, 1996; Singh, 1998; Vos *et al.*, 2003). However, these tissue treatments could affect immune cell biology or cell epitopes, thereby inducing variations in the cellular phenotypes and altering the flow cytometry profiles (Engelholm *et al.*, 1985; Stoeck *et al.*, 1990; Sutherland *et al.*, 1992; Mulder *et al.*, 1994; Abuzakouk *et al.*, 1996; Flynn *et al.*, 1999; Novelli *et al.*, 2000; Van Damme *et al.*, 2000). In this paper, we have investigated the optimal mechanical and enzymatic tissue disruption methods to isolate TIIC that would allow optimal phenotypic and functional analyses. We compared two enzymatic digestion protocols, using collagenase type IA 0.03% (Col I) alone or in combination with collagenase type IV 0.1% and DNase I type II 0.01% (Col I + IV), and

a mechanical disruption system using a Medimachine™ (Medi) (Novelli *et al.*, 2000; Godin-Ethier *et al.*, 2009) on solid tumors from human kidney, breast and lung cancer specimens. We determined that mechanical disaggregation by Medimachine™ was optimal for viability, cell surface marker expression and T cell proliferation studies.

## **Materials and methods**

### **Tumor and blood sample collection.**

Breast, kidney and lung tumor samples from patients who had recently undergone radical or partial mastectomies, nephrectomies and lung resection respectively, were collected and briefly stored in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco, Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). Surgery was performed at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Québec, Canada (CHUM). Breast tumor samples were provided by the CHUM/Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) breast cancer tissue bank of the FRSQ Cancer Network.

Peripheral blood samples were obtained from healthy donors recruited by the Division of Hematology and Immunodeficiency at the Royal Victoria Hospital (Montréal, Québec, Canada) and from cancer patients. This study was approved by the Ethics Committee of the CHUM. Informed consent was obtained from each donor or patient prior to the collection of the tumor and blood samples.

### **Preparation of tumor cell suspensions and THIC extraction**

All tumor specimens were kept on ice and processed within 2 h of resection. Each tumor sample was placed in a Petri dish on ice, carefully dissected free of surrounding normal and necrotic tissue and sliced into small pieces of approximately 2 mm<sup>3</sup> with a scalpel. To control for tumor infiltration heterogeneity, tumor fragments were mixed before separation into three portions. The first portion was mechanically disrupted while the two others were enzymatically digested. Mechanical disruption was performed using a Medimachine™ (DAKO, Cytomation; Glostrup, Denmark). Tumor fragments were placed in a sterile microblade-equipped polyethylene chamber (Medicon, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) with 1–2 mL of RPMI 1640 medium (Wisent; St-Bruno, Québec, Canada) and dissociated 3 to 4 times for 30 s at a constant speed of 100 rpm as described previously (Novelli *et al.*, 2000). The cell suspension was filtered through a porous polyester membrane (Filcons, BD Biosciences). After filtration, cells were washed twice with 1x Phosphate Buffer Solution, pH 7.0 (PBS, Wisent) at 300 g. Enzymatic digestions were performed on the other two pools of tumor pieces in RPMI 1640 medium. The first protocol used 0.03 % of type IA collagenase



(Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) (200 U/mL) while the second used 0.1 % type IV collagenase (Sigma-Aldrich) (530 U/mL), 0.001% type II DNase I (Sigma-Aldrich) (20 U/mL) and 0.03 % type IA collagenase. Generally, 5 mL of enzyme solution was required per 1 g (or less) of tissue. Digestions were performed at 37 °C for 2 h. The single-cell suspension obtained by enzymatic digestion was then passed through a 40 µm (BD Biosciences) sterile sieve to remove undigested tissue fragments and washed twice with PBS at 300 g for 5 min.

To obtain TIIIC-enriched samples free of erythrocytes, tumor cells and cell debris from the mechanical disruption and enzymatic digestion, cell suspensions were purified by centrifugation over a Leukocyte Separation Medium cushion (Wisent) at 300 g for 30 min. TIIIC were recovered from the interface, washed twice with PBS and stained for flow cytometry analysis.

#### **Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation.**

PBMC were isolated from heparinized whole blood samples of cancer patients or normal donors using Leukocyte Separation Medium (Wisent). Leukocyte separation medium (Wisent) cushion was carefully added to the bottom of the test tube containing whole blood diluted 1/2 with PBS. The mixture was then centrifuged at 300 g for 30 min and PBMC were recovered from the interface, washed twice and stained for flow cytometry analysis.

#### **Flow cytometry analysis.**

Cells were first stained with the Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) to discriminate between live and dead cells. Cells were stained with the following fluorescent dye-conjugated monoclonal antibodies (Mab) from BD Biosciences: CD3 Alexa-700, CD4 Fluorescein isothiocyanate (FITC), CD8 Allophycocyanin-H7 (APC-H7), CD19 Alexa-700, CD14 Pacific Blue (PB), CD45RA Phycoerythrin (PE), CD45RO Allophycocyanin (APC), and HLA-DR Phycoerythrin Cy7 (Pe-Cy7). Corresponding IgG isotypes were used as controls to account for non-specific binding (BD Biosciences). Before cell staining, non-specific binding sites were blocked with human gamma globulin (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA). Cell surface markers were stained for 30 min at

4°C, washed with staining buffer (PBS containing 1 % FBS and 0.1 % NaNO<sub>3</sub>) and then fixed in 2 % paraformaldehyde for 10 min at 4°C. Cells were washed and resuspended in staining buffer. Flow cytometry data were acquired using an LSR II instrument (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star). The mean fluorescence intensity (MFI) was calculated on cells stained positively with the specific conjugated Mab.

### **T cell proliferation.**

After PBMC or TIIC preparation,  $8 \times 10^5$  leukocytes were washed and resuspended in serum-free RPMI 1640 medium before staining for 15 min at 37 °C with 5 µM of Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probe, Invitrogen). Cells were washed and resuspended in 200 µl of complete medium consisting of Iscove's modified Dulbecco's medium (Invitrogen) supplemented with 7.5 % heat-inactivated AB serum (Gemini Bio-Products, Calabasas, CA, USA), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 µg/mL gentamicin (all from Wisent), 300 IU/ml of recombinant human IL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) and incubated 4 days in a plate previously coated overnight with 5 µg/mL of anti-CD3 (OKT3; eBiosciences, San Diego, CA, USA). Following incubation, cells were harvested by pipetting and proliferation was assessed by flow cytometry analysis as described above.

### **Statistical analysis.**

Statistical analyses were performed with general linear models using SPSS software version 18.0 for Windows (LEAD Technologies, Chicago, IL, USA). Multiple range comparisons of paired means were done using a Least Significant Difference (LSD) test with Bonferroni adjustment. Level of significance was set at  $p < 0.05$ . Data is reported as mean  $\pm$  SEM. Comparison between treated and untreated cells in marker and proliferation quantification was statistically analyzed by unpaired sample Student t test with a significance level of  $p < 0.05$ .

## Results

### **Mechanical and enzymatic disaggregation methods similarly affect cell viability.**

Our first objective was to evaluate TIIC viability following tumor disaggregation by either mechanical disruption using the Medimachine™ (Medi), or two different enzymatic treatments : 1) collagenase type IA (Col I) ; and 2) collagenase types IA and IV with DNase I type II (Col I+IV). Tumor specimens were obtained from 10 lungs, 5 breasts and 6 kidneys of cancer patients. After gating on CD3<sup>+</sup> T lymphocytes from TIIC prepared from lung (**Figure 9 A**), breast (**Figure 9 B**) and kidney tumors (**Figure 9 C**), no significant difference in the percentage of dead cells stained with respect to the method of tumor disaggregation ( $p>0.05$ ) or the type of tumor ( $p>0.05$ ) was observed. Tumor disaggregation routinely induced around 15 to 30 % cell mortality (**Figure 9**) but showed no statistical variation between methods. Similar observations were noted with CD19<sup>+</sup> B lymphocytes and CD14<sup>+</sup> monocytes (data not shown).

### **Tumor disaggregation procedures differently decrease detection of selected markers.**

We then attempted to evaluate the effects of tissue disaggregation directly on immune cells within PBMC, which lack the 3-dimensional architecture of a solid tumor. Consequently, these were used as genuine untreated controls for each experiment, which served as baseline for all parameters. PBMC from 5 normal donors were treated either mechanically by Medimachine™ or digested enzymatically for 30, 60, 90 or 120 min with methods previously described. The presence of eight commonly used lymphocyte and monocyte cell surface markers for PBMC identification was analyzed by flow cytometry before and after exposure to each disaggregation treatment. These markers included CD3, CD4 and CD8 (T lymphocytes), CD45RO (antigen-experienced T lymphocytes), CD45RA (naive and terminally-differentiated T lymphocytes (Arlettaz *et al.*, 1999)), HLA-DR (activated cells), CD19 (B lymphocytes), and CD14 (monocytes/macrophages).

Mechanical treatment by Medimachine™ did not induce any changes in the surface levels of any of these markers when compared to freshly isolated untreated cells ( $p>0.05$ ; **Figure 10**). The mean percentage expression of PBMC surface markers at each time point

within each enzymatic digestion condition was compared to undigested samples (**Figure 10**). The relative integrity of CD3 and CD45RO was not affected by the duration of digestion with Col I and Col I+IV ( $p>0.05$ ; data not shown). Likewise, Col I treatment did not affect CD45RA ( $p>0.05$ ; **Figure 10**). However, digestion of PBMC with Col I resulted in fading of CD14 and HLA-DR to 67% and 77% of undigested controls over the first 30 min, respectively, and was time-dependent ( $p<0.05$ ; **Figure 10**). Fading was also observed for CD4 after 60 min of digestion and for CD8 and CD19 after 90 min of treatment. Globally, Col I+IV treatment provoked a decrease in surface-detected CD4, CD8, HLA-DR, CD45RA, CD14 and CD19 within 30 min ( $p<0.05$ ; **Figure 10**). Markers such as CD4, CD45RA and CD14 were more sensitive to this treatment and lost nearly 80 % of initial marker levels after 120 min of incubation. Furthermore, this treatment caused a 50 % decrease in CD4 T cell marker detection after 30 min of incubation. Effect on CD8, HLA-DR and CD19 was moderate but reached 65 %, 67 % and 76 % of initial levels of control samples, respectively.

Similar experiments were performed on TIIC prepared from 10 lung (**Figure 13 A**), 5 breast (**Figure 13 B**) and 10 kidney tumors (**Figure 13 C**). Origin of TIIC (kidney, breast or lung) had no influence on the modulation of cell surface marker detection (CD3, CD4, CD19, CD14, CD45RO, CD45RA and HLA-DR) induced by the enzymatic disaggregation protocols ( $p>0.05$ ; results summarized in **Figure 11**). Reported decreases in cell surface markers were similar regardless of tissue origin. Because of variability between individual cell levels of specific markers, the collected data from each profile were normalized to the levels obtained from TIIC isolated by mechanical disaggregation. A value of 100% was assigned to TIIC isolated by Medimachine™ treatment based on results from PBMC where mechanical treatment had the slightest effects on surface markers. The CD3, CD45RO, CD19, HLA-DR and CD14 markers were not significantly affected by any of the three isolation protocols ( $p>0.05$ ; **Figure 11**). Col I treatment provoked a 20% decrease in CD4 detection on TIIC compared to Medimachine™ treatment in lung tumors ( $p<0.05$ ; **Figure 11**). This represented the only significant effect noted for this digestion protocol. On the other hand, Col I+IV treatment caused stronger fading of surface markers, particularly CD4, CD8 and CD45RA ( $p<0.05$ ; **Figure 11**). This protocol caused a decrease of nearly 65 % for CD4 and 40 % for CD45RA. Occasionally, this digestion protocol completely abolished the detection of these markers (**Figure 13** panel **A** CD4 and panel **C** CD45RA). Levels of CD8 in lung and kidney

tumors were also reduced by nearly 20 % with Col I+IV treatment. In summary, mechanical treatment by Medimachine™ had minimal effects on cell surface markers in all samples, while enzymatic treatments, particularly Col I+IV, caused a pronounced decrease of markers such as CD4, CD8 and CD45RA.

### **Enzymatic treatments alter T lymphocyte proliferation**

In order to evaluate disaggregation protocols' effects on cell proliferation, T lymphocytes were isolated from PBMC in heparinized whole blood samples collected from 6 normal donors and activated by CD3 stimulation in presence of IL-2. Cell proliferation was determined following 4 days of culture. We first demonstrated that the rate of cell proliferation was unchanged after mechanical treatment compared to untreated T cells, whereas enzymatic digestion, specifically Col I+IV treatment ( $p < 0.05$ ) decreased cell proliferation by 47 % (**Figure 12 A, B**). We also noted a decreased number of cell divisions (**Figure 12 C, D**), which indicates that enzymatic treatment decreased T cell proliferation potential. Similar observations were made for T lymphocytes isolated from two kidney tumors where mechanical isolation was associated with increased T cell proliferation compared to enzymatic treatments (**Figure 14**).

## Discussion

In the present study, TIIC single cell suspensions were prepared from lung, breast and kidney tumors by mechanical and enzymatic tissue disaggregation. Using flow cytometry, we obtained higher and preserved cell surface marker expression with a mechanical disaggregation protocol using the Medimachine™ allowing better cellular phenotypic characterization compared to enzymatic treatments which decreased CD4, CD8, CD45RA, CD14, HLA-DR and CD19 detection.

Previous studies reported the effects of disaggregation protocols on immune cell biology from different normal tissues (Flynn *et al.*, 1999; Van Damme *et al.*, 2000; Van Landuyt *et al.*, 2010) or tumors (Novelli *et al.*, 2000) but none of the above adapted their protocols to the various tumor tissue origins. In their study, Novelli *et al.* studied mechanical disaggregation with and without collagenase pre-treatment in regards to phenotype of lymphocytes from cutaneous cancers (Novelli *et al.*, 2000), but did not evaluate the effect of collagenase alone. Here, we chose to evaluate protocol consequences separately. Enzyme treatments are widely used to obtain cell suspensions from tissues; however, mechanical methods present numerous advantages. First, the procedure takes only minutes to perform compared to enzymatic digestion which can take several hours. To truly reflect in vivo conditions, cells must be analyzed promptly following surgery to encompass original state and characteristics and minimize modifications due to lengthy manipulation. Moreover, mechanical disaggregation is independent of tissue structure and characteristics; tumors possess a wide range of physical peculiarities depending on their stage and their tissue origin. As shown in the present study, mortality induced by mechanical treatment was similar to enzymatic digestion protocols selected, irrespectively of tissue origin and cell type (CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, CD19<sup>+</sup> B lymphocytes, CD14<sup>+</sup> monocytes).

Based on results obtained with PBMC, MFI of cell surface markers were unchanged following mechanical disaggregation with the Medimachine™ compared to untreated cells. In addition, TIIC biology appeared to be minimally affected by Medimachine™ as opposed to enzymatic treatments. Moreover, Medimachine™-treated lymphocytes obtained from PBMC were able to respond to proliferative signals to levels reminiscent of untreated cells. However, some of these observations were made only with PBMC due to a limiting number of TIIC

recovered from the three isolation techniques in all experiments. Evidently, treatment of PBMC already in suspension cannot be directly compared to TIIC isolated from a complex tissue such as a tumor, however in absence of a better control, PBMC were used as the reference point.

Nevertheless, results obtained for cell surface markers and proliferation with TIIC were generally similar compared with PBMC. Immunohistochemistry of paraffin-embedded clinical samples could appear as an alternative, but certain limitations prevent its use as a control of basal surface marker expression. Specifically, a slide represents a single plane of the complex tissue which cannot reflect the heterogeneity of the immune infiltrate. Therefore, extrapolations from these slides to reflect the entire TIIC population are impossible. However, it has been demonstrated that enzymatic treatments result in better extraction yield (Novelli *et al.*, 2000), making them attractive for cell isolation from solid tissues, especially to optimize recovery of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) for culture suitable for adoptive transfer (Yannelli *et al.*, 1996). Accordingly, we generally obtained more than three times the number of TIIC by enzymatic tissue digestion with Col I+IV compared to Medimachine™ but not with collagenase I alone (data not shown). This could be explained by the absence of DNase in the medium: during enzymatic digestion, release of DNA by dead cells can cause cell aggregation, decreasing the number of available TIIC. Yield can also vary with tissue composition; this parameter should thus be considered when choosing an optimal enzymatic cocktail for given tissues.

Enzymatic tissue treatment by Col I+IV induced a greater loss of marker expression, associated with a decrease in the markers' MFI, compared to Col I treatment. Differences between these two enzymatic mixtures consisted of the presence of type IV collagenase and type II DNase I. Mulder *et al.* (1994) and Flynn *et al.* (1999) previously reported that these enzymes alter cell surface markers. In their study, Mulder and colleagues reported that commercial DNase preparations are frequently contaminated with proteolytic enzymes such as proteases that recognize the amino-acid sequence of surface markers. This signal loss can be attenuated with highly purified DNase preparation. This could explain the cell surface marker loss we observed. To discriminate whether this marker loss was induced by the presence of DNase or type IV collagenase, it would be necessary to perform tissue disaggregation with a combination of type I and IV collagenase without DNase, particularly considering

Van Damme et al.'s demonstration that DNase affects CD8 but not CD4 (Van Damme *et al.*, 2000). Extensive optimization was required to establish the optimal enzyme concentration used in our study.

Given the robust nature of flow cytometry, the quality of phenotypic analysis is dependent on cell surface receptor integrity. The fading of surface markers induced by enzymatic treatments can be countered by in vitro culture of cells (Stoeck *et al.*, 1990) frequently done for TIIC. This culture period has proven sufficient to fully restore basal levels of all affected surface makers (Mulder *et al.*, 1994) but has the disadvantage of inducing cell biology modifications due to culture. Consequently, it is critical to develop tools to analyze TIIC as soon as possible after enrichment.

In conclusion, our data highlight the fact that Medimachine™ disaggregation is an efficient method for single-cell preparation regardless of tumor origin. Although this mechanical method has its strengths and weaknesses, enzymatic tissue treatment could induce artefactual results. It would therefore be recommended that all studies using enzymes for cell isolation be minimally tested on PBMC to evaluate the treatment's impact on chosen markers.

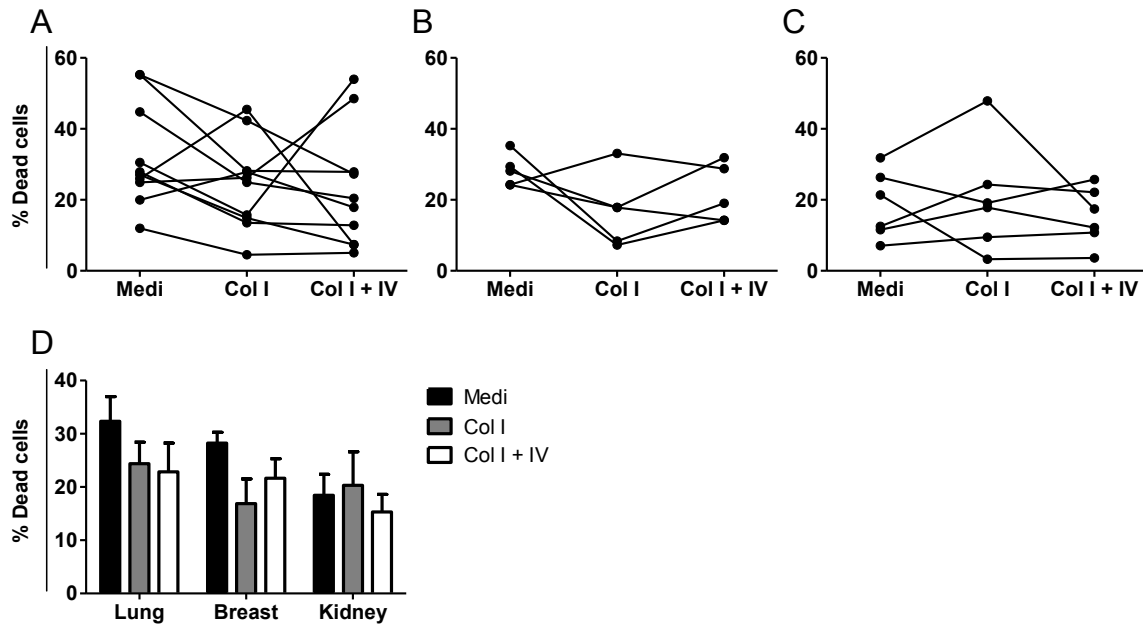


## **Acknowledgements**

Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), affiliated to the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). We kindly thank Urszula Krzemien for the management of clinical samples and databases. Thanks to Vicky Thiffault for her help in collecting lung cancer samples. Thanks to Miguel Chagnon from the Universit. de Montr.al statistics service. Thanks to Alexandre Reuben and Edward Bagu for critical review of the manuscript.

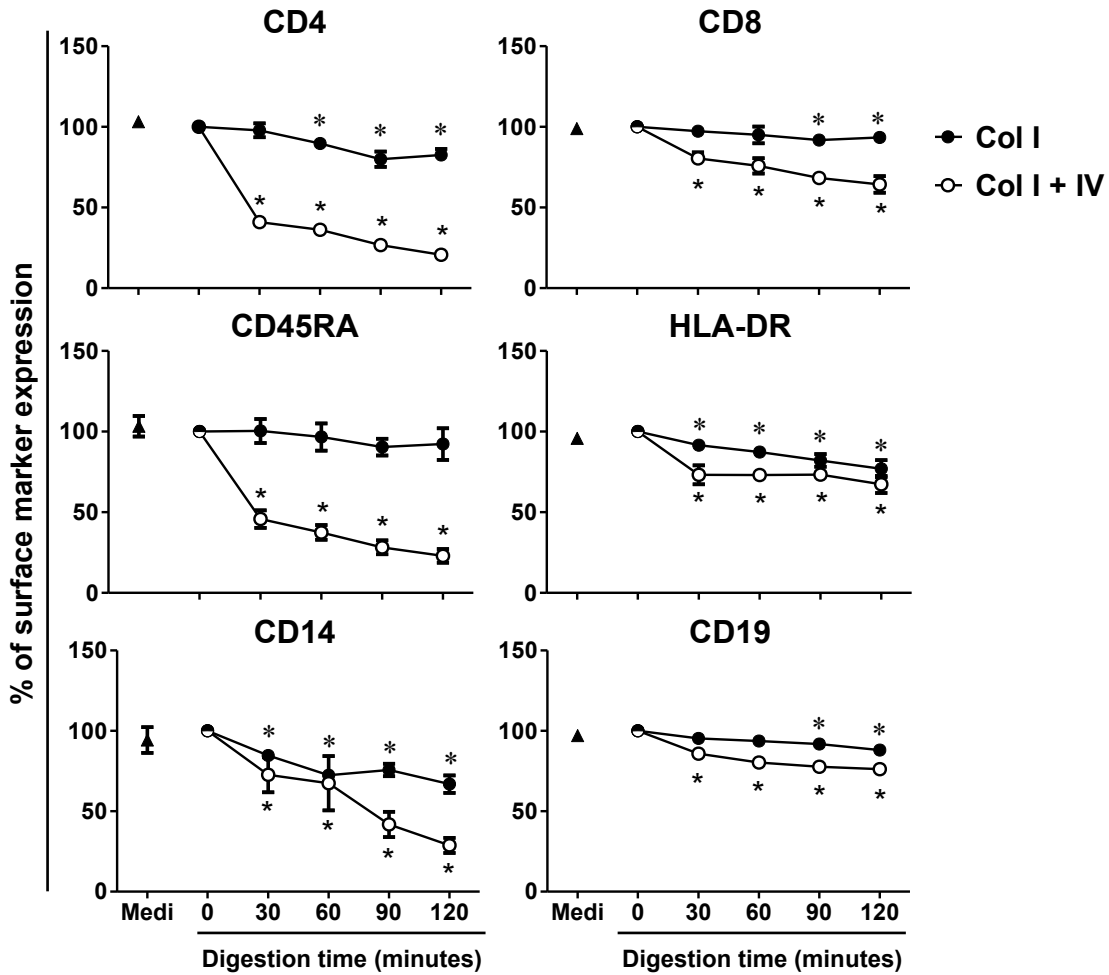
# Figures

Grange *et al.*



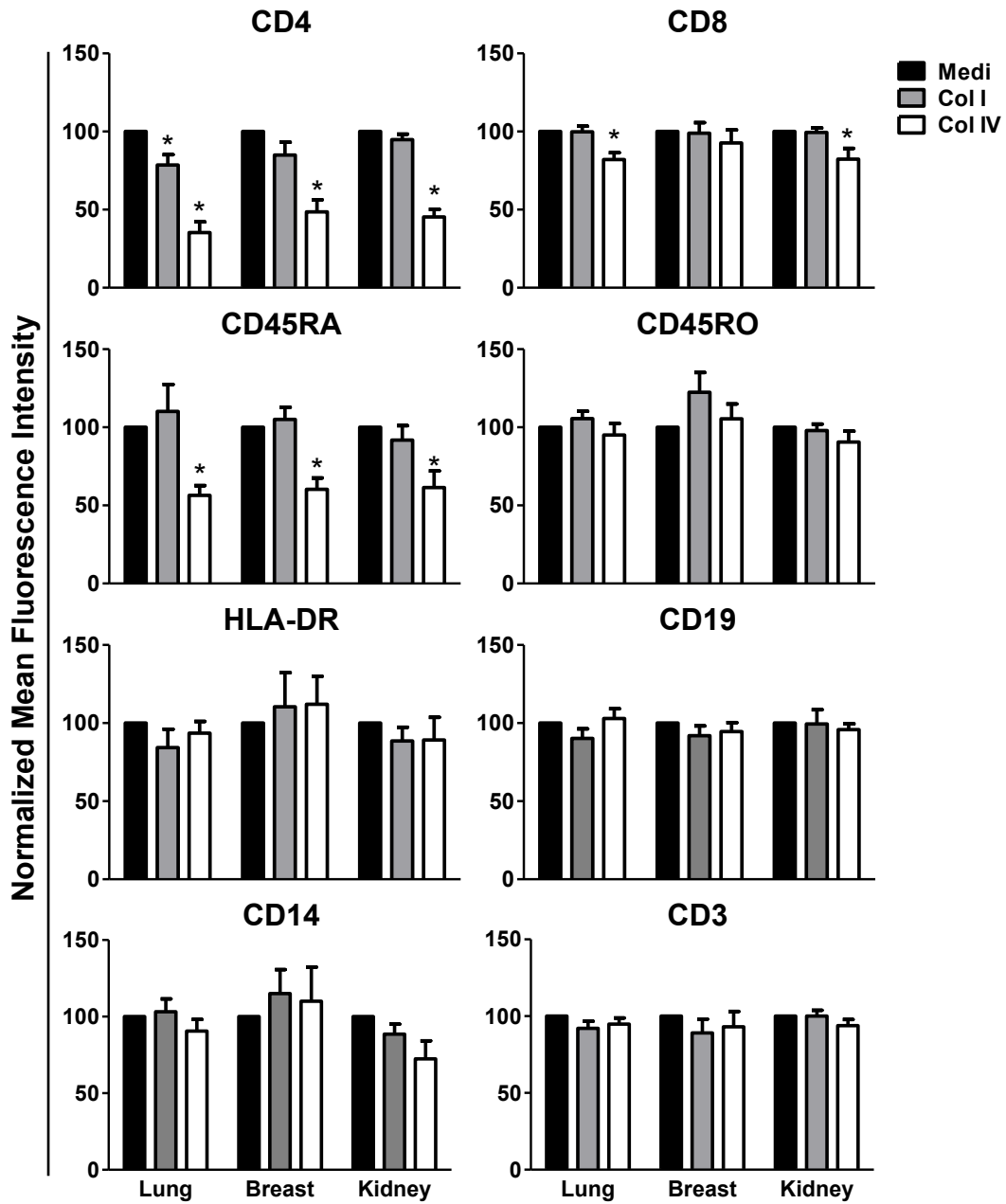
**Figure 9 (1<sup>m1</sup>) : Effect of disaggregation methods on cell viability.**

The percentage of dead lymphocytes (CD3<sup>+</sup>/Dead dye<sup>+</sup> cells) was determined in THIC following 3x30 seconds of grinding using a Medimachine™ (Medi) or 2 h of tissue digestion using two enzymatic digestion protocols (Col I or Col I + IV). Observations for 10 lung cancer patients (A), 5 breast cancer patients (B) and 6 kidney cancer patients (C) are shown. Samples from the same patient are connected by solid lines. (D) Summary of observations (mean ± SEM). Statistical significance was evaluated by the LSD test with \*P<0.05.



**Figure 10 (2<sup>ml</sup>): Evaluation of cell surface marker detection after enzymatic treatment of PBMC.**

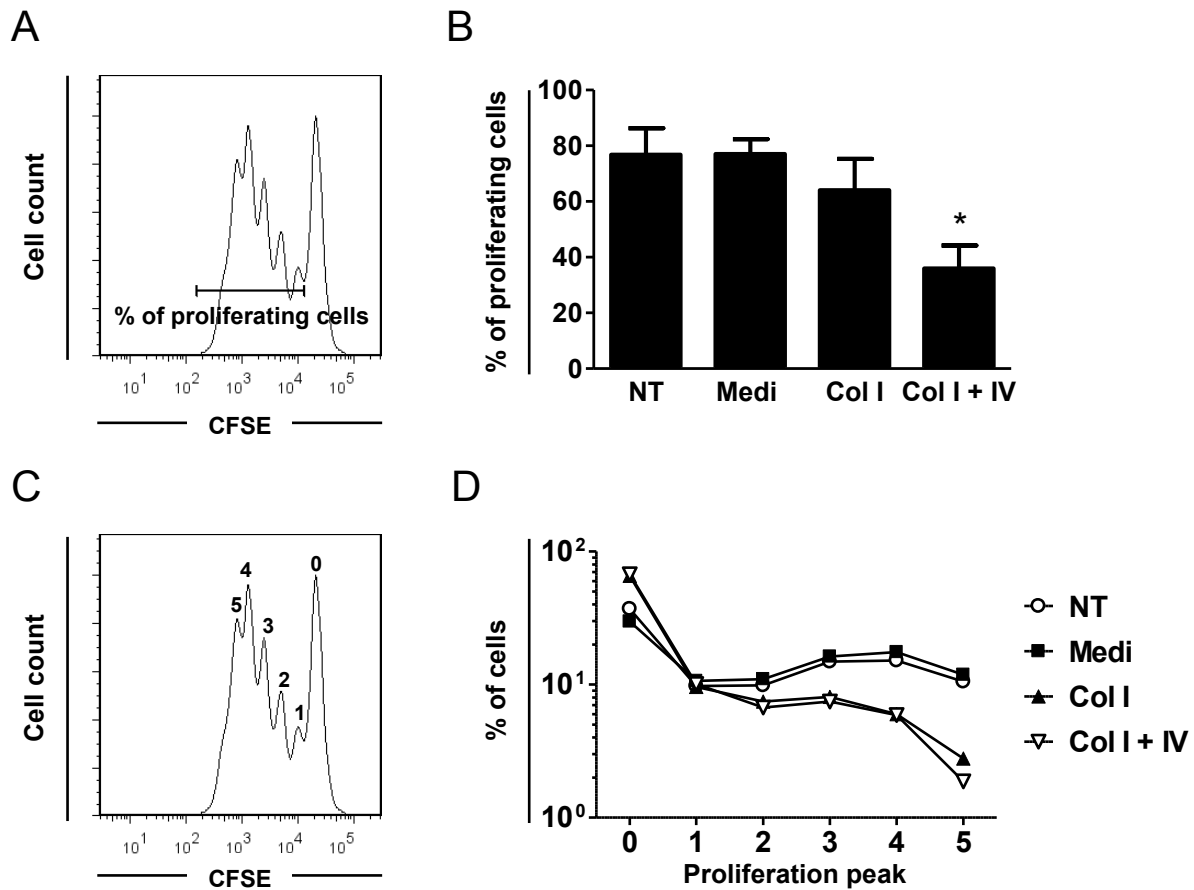
PBMC from 5 normal donors were treated by two enzymatic treatments (Col I or Col I + IV). Mean Fluorescence Intensity of surface markers was evaluated for each marker before and after treatment. Mean  $\pm$  SEM is calculated on percentage of surface marker expression compared to basal expression of untreated cells. Statistical significance was evaluated by the Student t test with  $p < 0.05$  considered as statistically significant (\* for Col I and \* for Col I + IV).



**Figure 11 (3<sup>ml</sup>): Effect of disaggregation methods on TIIC surface marker detection.**

Tumor tissues from 10 lung, 5 breast, and 10 kidney tumors were disaggregated mechanically by Medimachine™ (Medi; black bars) or enzymatically (Col I gray bars; or Col I + IV white bars). Detection of 8 TIIC surface markers was evaluated by flow cytometry. Mean Fluorescence Intensity (MFI) was determined and normalized with mechanical disaggregation (100 % of marker expression). Transformed data are represented as

mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was evaluated by the Bonferroni LSD with test with \* $p < 0.05$ .

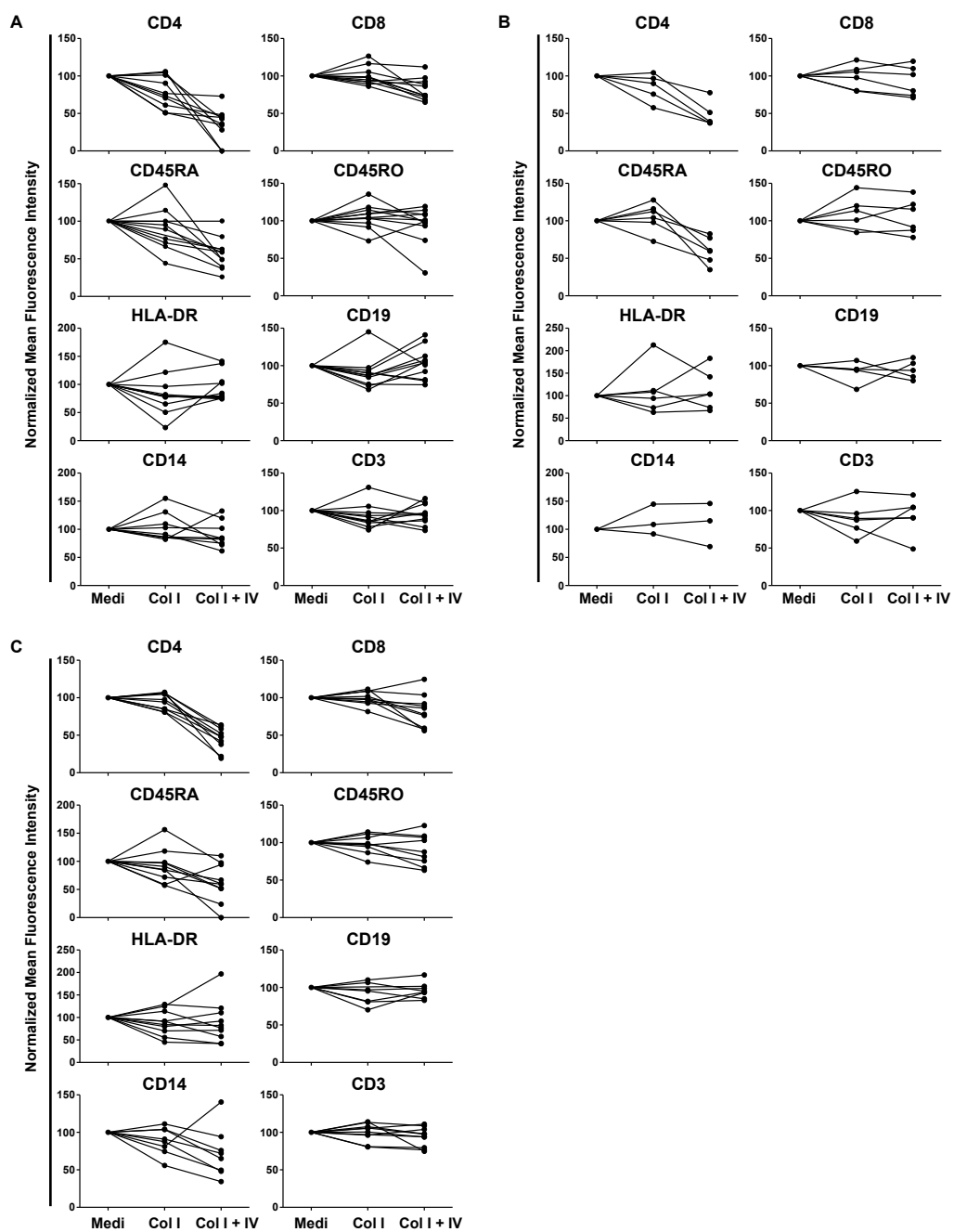


**Figure 12 (4<sup>ml</sup>): Effect of disaggregation methods on T lymphocyte proliferation.**

PBMC from 6 normal donors were stained by CFSE and treated either by grinding using Medimachine™ (Medi) or by enzymatic digestion for 2 h using either Col I or Col I+IV, while the control cells were not treated (NT). Aliquots for each of the four treatments were treated with either IL-2 alone, or IL-2 combined with OKT3. The percentage of proliferating lymphocytes was determined by flow cytometry after 5 days in culture for each donor (A representative graph from one donor). Percentage of proliferation for the 6 patients was then determined and the data presented as mean ± SEM with the level of significance set at \*p<0.05 (B). The cell proliferative capacity for each donor was determined by the percentage of cells in each division peak (C, peak 0 represented unproliferated cells). D is representative of one donor.

# Supplementary data

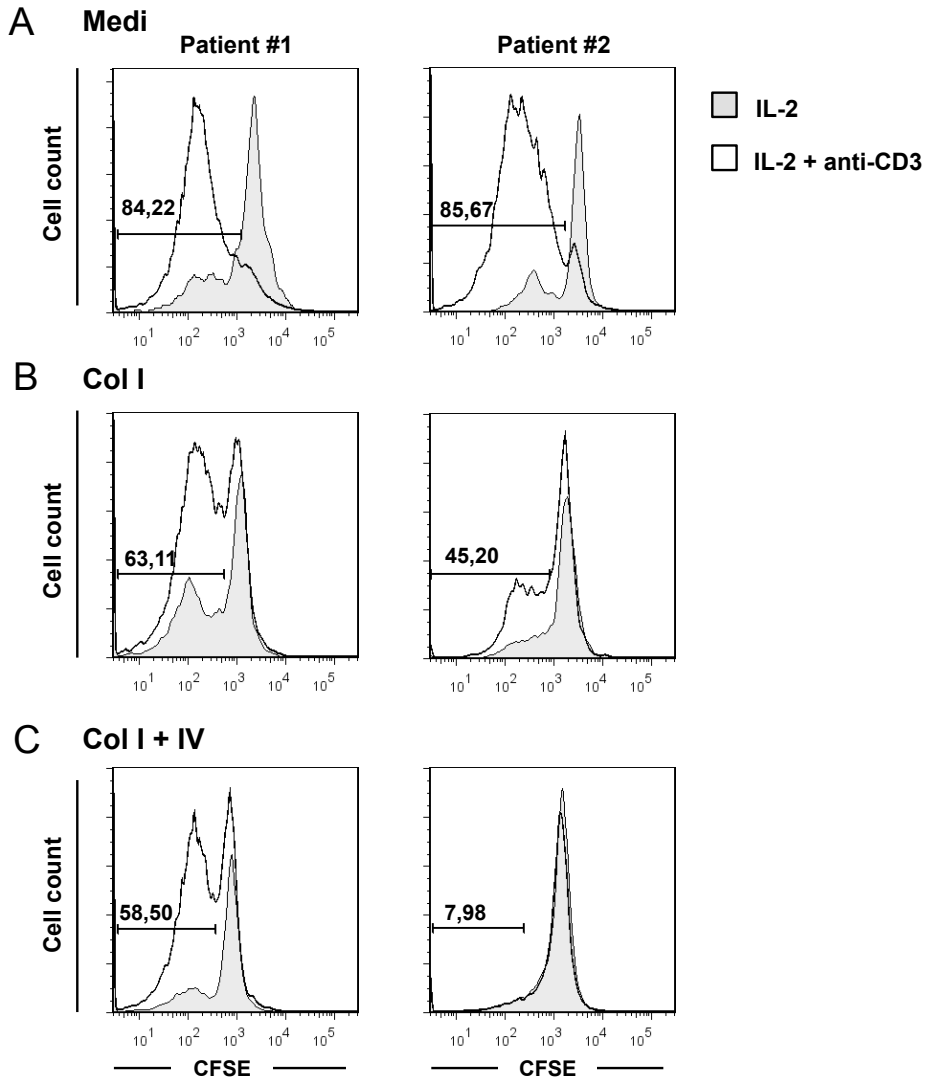
Grange *et al.*



**Figure 13 (supplementary data 1<sup>ml</sup>): Marker expression in THIC extracts from lung, breast, and kidney tumors after treatment.**

Marker level in TIIC extracts from **(A)** lung, **(B)** breast, and **(C)** kidney tumors after treatment. Mean Fluorescence Intensity of 8 markers from TIIC of 10 lung, 5 breast and 10 kidney tumors normalized to the result obtained with the mechanical disaggregation by Medimachine™ (100 % of marker expression) are represented. Cell surface marker level in a same tumor treated by mechanical (Medi) and enzymatic (Col I or Col I + IV) treatments are connected by a solid line.





**Figure 14 (supplementary data 2<sup>ml</sup>): Effect of disaggregation on kidney tumor infiltrating lymphocyte proliferation.**

Tumor infiltrating lymphocytes were extracted from two kidney tumor tissues by (A) grinding using Medimachine™ (Medi), or by (B) enzymatic digestion for 2 h using either Col I or (C) Col I + IV. Cells were then stained with CFSE and cultured 5 days with IL-2 and CD3 activation (white line) or without activation (gray). Percentage of proliferating lymphocytes was determined by flow cytometry.

## References

- Abuzakouk, M., Feighery, C. and O'Farrelly, C., 1996. Collagenase and Dispase enzymes disrupt lymphocyte surface molecules. *J Immunol Methods*. 194, 211-6.
- Arlettaz, L., Barbey, C., Dumont-Girard, F., Helg, C., Chapuis, B., Roux, E. and Roosnek, E., 1999. CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+)CD45RA(-)RO(+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol*. 29, 3987-94.
- Cerra, R., Zarbo, R.J. and Crissman, J.D., 1990. Dissociation of cells from solid tumors. *Methods Cell Biol*. 33, 1-12.
- Cornacchiari, A., Grigolato, P.G., Facchetti, F., Morassi, M.L., Cadei, M., Alpi, F., Battocchio, S. and Chirico, E., 1995. Usefulness of the scraping method for DNA flow cytometry in breast tumors. *Cytometry*. 19, 263-6.
- Cunningham, R.E., 2010. Tissue disaggregation. *Methods Mol Biol*. 588, 327-30.
- de Visser, K.E., Eichten, A. and Coussens, L.M., 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 6, 24-37.
- Engelholm, S.A., Spang-Thomsen, M., Brunner, N., Nohr, I. and Vindelov, L.L., 1985. Disaggregation of human solid tumours by combined mechanical and enzymatic methods. *Br J Cancer*. 51, 93-8.
- Flynn, L., Carton, J., Byrne, B., Kelehan, P., O'Herlihy, C. and O'Farrelly, C., 1999. Optimisation of a technique for isolating lymphocyte subsets from human endometrium. *Immunol Invest*. 28, 235-46.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H. and Pages, F., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 313, 1960-4.
- Godin-Ethier, J., Pelletier, S., Hanafi, L.A., Gannon, P.O., Forget, M.A., Routy, J.P., Boulassel, M.R., Krzemien, U., Tanguay, S., Lattouf, J.B., Arbour, N. and Lapointe, R., 2009. Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. *J Immunol*. 183, 7752-60.
- Grivnennikov, S.I., Greten, F.R. and Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 140, 883-99.
- Hamburger, A.W. and Salmon, S.E., 1977. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*. 197, 461-3.
- Moloney, M. and Shreffler, W.G., 2008. Basic science for the practicing physician: flow cytometry and cell sorting. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 101, 544-9.
- Mulder, W.M., Koenen, H., van de Muysenberg, A.J., Bloemena, E., Wagstaff, J. and Scheper, R.J., 1994. Reduced expression of distinct T-cell CD molecules by collagenase/DNase treatment. *Cancer Immunol Immunother*. 38, 253-8.
- Novelli, M., Savoia, P., Cambieri, I., Ponti, R., Comessatti, A., Lisa, F. and Bernengo, M.G., 2000. Collagenase digestion and mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Clin Exp Dermatol*. 25, 423-31.

- Ottesen, G.L., Christensen, I.J., Larsen, J.K., Hansen, B. and Andersen, J.A., 1996. Tissue disaggregation for flow cytometric DNA analysis: comparison of fine-needle aspiration and an automated mechanical procedure. *Cytometry*. 26, 65-8.
- Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartour, E., Sautes-Fridman, C. and Fridman, W.H., 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 29, 1093-102.
- Rasey, J.S. and Nelson, N.J., 1980. Effect of tumor disaggregation on results of in vitro cell survival assay after in vivo treatment of the EMT-6 tumor: x-rays, cyclophosphamide, and bleomycin. *In Vitro*. 16, 547-53.
- Salmon, S.E., Hamburger, A.W., Soehnen, B., Durie, B.G., Alberts, D.S. and Moon, T.E., 1978. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med*. 298, 1321-7.
- Singh, N.P., 1998. A rapid method for the preparation of single-cell suspensions from solid tissues. *Cytometry*. 31, 229-32.
- Stoeck, M., Miescher, S., Qiao, L., Capasso, P., Barras, C. and von Fliedner, V., 1990. Stimulation of FACS-analysed CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> human tumour-infiltrating lymphocytes with ionomycin + phorbol-12,13-dibutyrate does not overcome their proliferative deficit. *Clin Exp Immunol*. 79, 105-8.
- Sutherland, D.R., Abdullah, K.M., Cyopick, P. and Mellors, A., 1992. Cleavage of the cell-surface O-sialoglycoproteins CD34, CD43, CD44, and CD45 by a novel glycoprotease from *Pasteurella haemolytica*. *J Immunol*. 148, 1458-64.
- Talmadge, J.E., Donkor, M. and Scholar, E., 2007. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev*. 26, 373-400.
- Van Damme, N., Baeten, D., De Vos, M., Demetter, P., Elewaut, D., Mielants, H., Verbruggen, G., Cuvelier, C., Veys, E.M. and De Keyser, F., 2000. Chemical agents and enzymes used for the extraction of gut lymphocytes influence flow cytometric detection of T cell surface markers. *J Immunol Methods*. 236, 27-35.
- Van Landuyt, K.B., Jones, E.A., McGonagle, D., Luyten, F.P. and Lories, R.J., 2010. Flow cytometric characterization of freshly isolated and culture expanded human synovial cell populations in patients with chronic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 12, R15.
- Vos, J.A., Simurdak, J.H., Davis, B.J., Myers, J.B. and Brissette, M.D., 2003. Vortex disaggregation for flow cytometry allows direct histologic correlation: a novel approach for small biopsies and inaspirable bone marrows. *Cytometry B Clin Cytom*. 52, 20-31.
- Yannelli, J.R., Hyatt, C., McConnell, S., Hines, K., Jacknin, L., Parker, L., Sanders, M. and Rosenberg, S.A., 1996. Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int J Cancer*. 65, 413-21.

## **3<sup>ème</sup> Section : Manuscrit II**

Human tumors are infiltrated by CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> (MCAM) T lymphocytes displaying an immunosuppressive signature.

Article en preparation.

**Human tumors are infiltrated by CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> (MCAM) T lymphocytes displaying an immunosuppressive signature.**

Cécile Grange<sup>a</sup>, Alexandre Reuben<sup>a</sup>, Nathalie Arbour<sup>b</sup>, Marie-Andrée Forget<sup>c</sup>, Mathieu Latour<sup>d</sup>, Alexandre Prat<sup>b,e</sup>, Jean-Baptiste Lattouf<sup>f</sup>, Jocelyne Martin<sup>g</sup>, Moishe Liberman<sup>g</sup>, Jean-François Cailhier<sup>a,h</sup> and Réjean Lapointe<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9.

<sup>b</sup> Neuroimmunology Research Laboratory, Centre of Excellence in Neuromics, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9.

<sup>c</sup> Department of Melanoma Medical Oncology, University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA, 77030.

<sup>d</sup> Department of Pathology, CHUM, Montréal, Québec, Canada H2X 3J4.

<sup>e</sup> Multiple Sclerosis Clinic, Department of Neurology, Université de Montréal, CHUM-Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1.

<sup>f</sup> Department of Urology, CHUM, Montréal, Québec, Canada H2X 3J4.

<sup>g</sup> Department of Surgery, Université de Montréal, Division of Thoracic Surgery, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

<sup>h</sup> Department of Medicine, Renal Division, CHUM, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

**Contribution des auteurs:**

*C. Grange est responsable de la réalisation des travaux de recherche. La rédaction de cet article a été réalisée par C. Grange en collaboration avec A. Reuben, R. Lapointe et J-F. Cailhier. M-A. Forge a apporté une contribution technique. A. Prat N. Arbour ont apporté une réflexion critique et intellectuelle. J. Martin, M. Liberman, M. Latour, J-B Lattouf ont contribué à l'obtention des échantillons cliniques utilisés pour les travaux de recherche.*

**Key Points:**

CD146 expression is enriched among tumor infiltrating immune cells particularly in CD4 T lymphocytes with an immuno-suppressive profile.

Tumor cells and more particularly necrotic tumor cells could participate to CD146 induction in immune cells.

**Abbreviation:**

7-AAD: 7-Aminoactinomycin D  
APC : allophycocyanine  
ATCC : American Type Culture Collection  
BBB : blood–brain barrier  
BFA: brefeldin A  
CAM: cell adhesion molecule  
CCI : canalar carcinoma invasive  
CCRCC: clear cell renal cell carcinoma  
CFSE: carboxyfluorescein succinimidyl ester  
CIS: carcinoma in situ  
CNS :central nervous system  
CP: cancer patients  
DF : depleted fraction  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis  
ER: estrogen receptor  
FBS: fetal bovine serum  
FITC: fluorescein isothiocyanate  
HD: healthy donors  
IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase  
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium  
IPA: Ingenuity Pathway Analysis™  
MCAM: melanoma cell adhesion molecule  
MDSC: myeloid-derived suppressor cells  
PB: pacific blue  
PBMC : peripheral blood mononuclear cells  
PBS: phosphate buffered saline  
PE: phycoerythrin  
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate  
PRCC: papillary renal cell carcinoma  
PR: progesterone receptor

RCC: renal cell carcinoma  
TAT: tumors and tumor-adjacent tissues  
TATIIC: tumor-adjacent tissue-infiltrating immune cells  
TF: total fraction  
TIIC: tumor infiltrated by immune cells  
TIL: tumor infiltrating lymphocytes  
Th : T helper  
TNM : tumor-node-metastasis  
Treg: regulatory T lymphocytes  
VEGF: vascular endothelial growth factor  
VEGFR2: VEGF receptor 2

## Abstract

Solid tumors are composed of a mix of different cell types, including immune cells with an activated phenotype which play an important role in tumor outcome. However, tumors continuously release factors promoting recruitment and polarization of immune cells towards an immunosuppressive, pro-tumor phenotype. In this study, we investigated CD146 (MCAM) on immune cells infiltrating tumors. CD146 is an adhesion molecule known to be involved in rolling, extravasation and migration during leukocyte recruitment to inflammatory sites.

We investigated a population of CD146<sup>+</sup> immune cells detected in tumors from breast, lung, and kidney cancers, and the mechanisms responsible for their accumulation. We show an enrichment of CD146<sup>+</sup> cells in tissues compared to patient-matched circulating immune cells. Although CD146 was present on multiple cell subtypes, the most prevalent expression was observed in CD4 T lymphocytes, which presented suppressive and regulatory T cell-like properties. Finally, we used an *in vitro* transmigration model and demonstrated that CD146 expression is increased by live and further enhanced by necrotic tumor cells. The tumor microenvironment may induce CD146 expression in immune cells particularly in immunosuppressive cells to increase their migration capacities. A better understanding of the biology of CD146<sup>+</sup> cells and of the necrotic tumor microenvironment may help to develop efficient immunotherapy strategies to promote tumor eradication.



## Introduction

Solid tumors are complex and heterogenous structures infiltrated by immune cells (TIIC) presenting an activated phenotype [1]. However, tumors evolve to suppress anti-tumor immune cell functions through diverse mechanisms [2] the production of immunosuppressive enzymes indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [3, 4], the recruitment and expansion of suppressive immune cell populations such as myeloid-derived suppressor cells (MDSC) [5], M2 macrophages [6], and regulatory T lymphocytes (Treg) [7], and down-modulation of antigen presentation properties [8], amongst others. These mechanisms contribute to tumor growth and progression resulting in tumor hypoxia and necrosis [9]. Many tumors require neo-vasculature to supply oxygen and nutrients to rapidly dividing tumor cells. Accordingly, tumors secrete factors like the vascular endothelial growth factor (VEGF) in hypoxic conditions, which are known to promote angiogenesis and tumor progression [10]. Interestingly, angiogenesis has been linked to the cell adhesion molecule (CAM) CD146 also named the melanoma cell adhesion molecule (MCAM), an endothelial cell marker, identified as a co-receptor for VEGF receptor 2 (VEGFR2) [11].

For decades, this CAM has been characterized in human immune cells [12-15]. Studies have reported CD146 involvement in the process of rolling, extravasation and migration during leukocyte recruitment to inflammatory sites [16-18] through homotypic [19] and heterotypic [18, 20] interactions. However, recent work has demonstrated that CD146 blockade restricts migration of a CD4 T helper (Th) cell population secreting IL-17A and IL-17F (Th17) across the blood–brain barrier (BBB) *in vitro*, while reducing infiltration of Th17 cells into the central nervous system of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice *in vivo* [15], thereby confirming a role for CD146 in the adhesion and migration of immune cells.

Considering the importance of angiogenesis and immunosuppression for cancer progression, we evaluated the presence of CD146-positive infiltrating immune cells in lung, breast and kidney tumors. Here, we show an enrichment of CD146 cells among tumor infiltrating immune cells, specifically in CD4 T lymphocytes, compared to patient-matched

circulating immune cells. Furthermore, we investigated the role of tumor microenvironment in the induction of CD146 expression on immune cells. We have demonstrated that CD146 expression is promoted by live and necrotic tumor cells. We demonstrated that CD146 expression is promoted by live and enhanced by necrotic tumor cells. Finally, we characterized the phenotype and properties of CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells found in tumors and we showed that these cells had enhanced regulatory T cell-like properties.

## **Patients, Materials and Methods**

### **Cell lines and culture conditions.**

All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). KTCL-140 and A-498 kidney tumor cell lines (both VHL<sup>-/-</sup>RCC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complete medium (10 % Foetal Bovin Serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 µg/mL gentamicin) (all from Wisent, St-Bruno, Québec, Canada). MDA-MB-231 and MCF7 kidney tumor cell lines were cultured in RPMI-1640 supplemented 10 % FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 µg/mL gentamicin.

In all peripheral blood mononuclear cell (PBMC) co-cultures, 300 IU/mL of recombinant human IL-2 (Peprotech; Rocky Hill, NJ, USA) were added. In activated conditions, we added 30 ng/mL anti-CD3 (OKT3 clone; eBioscience; San Diego, CA, USA) and 1 ng/mL of anti-CD28 (Becton Dickinson (BD) Biosciences, San Jose, CA).

### **Clinical specimens.**

Kidney, lung and breast tumors and tumor-adjacent tissues (TAT) were obtained following total or partial organ excision and briefly stored in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco, Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). Surgery was performed at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Québec, Canada. Clinico-pathological characteristics obtained from pathology reports are presented in **Tables 2, 3 and 4**. Venous blood samples were obtained from healthy donors (HD) or from cancer patients (CP) at the time of surgery. All study subjects signed an informed patient consent form. The project was reviewed and approved by the Ethics Committee of the CHUM.

### **Immune cell extraction from tumors and venous blood.**

All tissue specimens were kept on ice and processed within 2 h after tumor resection. Samples were placed in a Petri dish on ice, carefully dissected free of surrounding normal and necrotic tissue and sliced into small pieces of approximately 2 mm<sup>3</sup> with a scalpel. Tissues were then disrupted by Medimachine™ (BD Biosciences) as previously described [19]. Venous blood was collected in heparinized vacutainers (BD Biosciences). Tumor

homogenates and blood samples were enriched by centrifugation over a Leukocyte Separation Medium cushion (Wisent) at 300 g for 30 minutes. Immune cells were recovered from the interface, washed twice with Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X and stained for flow cytometry analysis.

### **Flow cytometry and intracellular staining.**

Before cell staining, non-specific binding sites were blocked with human gamma globulin (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA). Cells were first stained with the Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) to exclude dead cells. Cell surface markers were stained for 30 min at 4°C, washed with staining buffer (PBS containing 5 % FBS and 0.1 % NaNO<sub>3</sub>) using the following fluorescent dye-conjugated monoclonal antibodies: CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD11c, CD14, CD25, CD39 (all from BD Biosciences) and CD146 from (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). For intracellular staining, cells were treated with a Fixation/Permeabilization kit (eBioscience) and stained with Foxp3, IFN- $\gamma$  (BD Biosciences) or IL-17A (eBioscience) monoclonal antibodies. For lymphocytes, intracellular stained cells were previously activated 16 h with 20 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich; Oakville, Ontario, Canada) and 1  $\mu$ g/mL of ionomycin (Cedarlane; Burlington, Ontario, Canada) in presence of 5  $\mu$ g/mL of brefeldin A (BFA) (Sigma-Aldrich). Flow cytometry data were acquired using a Fortessa instrument (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

### **Co-culture assays**

PBMC from HD were depleted in CD146-positive cells using an anti-CD146 magnetic bead kit (CD146 Microbeads Kit ; Miltenyi Biotec). These cells ( $5 \times 10^5$ ) were co-cultured for 3 days with  $2.5 \times 10^5$  untreated or thermal shock-induced necrotic tumor cells in 48 well plates in activating or non-activating conditions (as described previously). Necrosis was induced in tumor cell lines by thermal shock consisting of a “cold” shock of 5 freeze-thaw cycles of 5 min at -80°C and 37°C or of a “heat” shock consisting of 5 cycles of 5 min at 60°C and 4°C. Necrotic status was evaluated by flow cytometry using 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) and Annexin V (BD Biosciences) staining. PBMC alone in complete appropriate medium were

used as a control. All conditions were performed in duplicate for each donor. CD146 expression was evaluated by flow cytometry following 48 and 72 h of co-culture.

### **Migration assays.**

Migration was performed by Boyden chamber assay with 3- $\mu$ m pore size polyethylene terephthalate membrane (BD Falcon) in cell line-appropriate medium. A suspension of  $1.5 \times 10^6$  CD146-depleted PBMC (see follow) from HD were added to the top chamber and allowed to migrate for 24 h. KTCL-140 cells ( $0.75 \times 10^6$ ) were added to the bottom chamber in complete appropriate medium in activating or non-activating conditions (as described previously). Cells having migrated to the lower chamber and not having migrated were then harvested and stained for CD146 expression by flow cytometry before being analyzed as previously described.

### **Co-culture assays.**

PBMC from HD were depleted in CD146-positive cells as previously described. DF cells ( $5 \times 10^5$ ) were co-cultured for 3 days with  $2.5 \times 10^5$  untreated or thermal shock-induced necrotic tumor cells in activating or non-activating conditions in 48 well plates. PBMC alone in complete appropriate medium with or without activating conditions were used as a control. All conditions were performed in duplicate for each donor. CD146 expression was evaluated by flow cytometry following 48 and 72 h of co-culture.

### **Gene expression array.**

Tumors from three kidney tumor patients (**Table 5**) were sliced into small fragments (2-4 mm) and dissociated using the GentleMACS (Miltenyi Biotec) mechanical method. Fragments of 0.2-2 g were placed in a GentleMACS C-tube with 5 mL of RPMI 1640 medium (Wisent) complemented with type IV collagenase (1 mg/mL; Sigma-Aldrich), DNase I (0.1 mg/mL; Sigma-Aldrich), 100 U/mL Penicillin/Streptomycin and 10  $\mu$ g/mL Gentamicin. C-tube was placed in the GentleMACS and run three times according to the manufacturer's instructions. Each run was followed by 30 min of incubation at 37°C. Single-cell suspensions

obtained were then passed through a 40 µm sterile sieve (BD Biosciences) to remove undigested tissue fragments and washed twice with PBS at 300 g for 5 min.

TiIC were then enriched as described above, and cells were incubated 20 h in IMDM supplemented with 7.5 % heat-inactivated human AB serum (Gemini Bio-Products Calabasas; CA, USA), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL Penicillin/Streptomycin and 10 µg/mL Gentamicin.

CD3<sup>+</sup> T cells were isolated using EasySep Positive Selection Human CD3<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit (STEMCELL Technologies Inc.; Vancouver, BC, Canada).

Cells were stained in sorting buffer (PBS, 5 % FBS, 25 mM HEPES) with dye-conjugated monoclonal antibodies to CD146-AlloPhycoCyanine (APC), CD3-Alexa 700, CD4-Pacific Blue (PB), CD45-Phycoerythrin-Cy7 (PeCy7) and cells positive for CD8, CD56 and CD14 in fluorescein isothiocyanate (FITC) were excluded from analysis. CD45/CD3/CD4/CD146<sup>+</sup> and CD45/CD3/CD4/CD146<sup>-</sup> cells were sorted using the BD Aria II cell sorter (BD Biosciences).

Qiagen RNeasy Micro Kit was used for RNA extraction and RNA quality was confirmed via the Agilent 2100 Bioanalyzer platform (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA). Gene expression analysis was performed using the Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies). Fluorescence signals of the hybridized Agilent Microarray were detected using Agilent's Microarray Scanner System (Agilent Technologies). The Agilent Feature Extraction Software was used to read and process microarray image files. For the identification of differential gene expression, derived output data files were further analyzed using the Rosetta Resolver® gene expression data analysis system (Rosetta Biosoftware). Common genes with a fold change  $\geq 2$  in all three patients were identified by the Venny interactive tools. Gene identification was performed by Ingenuity Pathway Analysis™ (IPA).

### **CFSE-based suppression assays.**

Tumors from three lung cancer patients were sliced into small fragments (2-4 mm) and dissociated using the GentleMACS mechanical method as previously described. Cell suspensions were purified and stained with the dye-conjugated monoclonal antibodies CD146-APC, CD3-Alexa 700, CD4-PB, CD45-PeCy7, CD25-PE and cells expressing CD8, CD56 and CD14 FITC were excluded. CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> and

CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD146<sup>-</sup> cells as regulatory cells, and CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> as effector T cells were isolated using the BD Aria II cell sorter (BD Biosciences). Foxp3 expression was controlled in each population by intracellular staining.

A carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-based assay for suppression of effector T cell proliferation was performed, as previously described [22]. Briefly, freshly-sorted effector T cells (6X10<sup>3</sup> cells) were labeled with CFSE (5 μM) and co-cultured with suppressive cells (6X10<sup>3</sup> cells or 1.66X10<sup>3</sup> cells) in 96-well U-bottom plates in the presence of irradiated PBMC (30X10<sup>3</sup> cells) and anti-CD3 (30 ng/ml) for 72 h. Effector T cell proliferation was determined by flow cytometry.

### **Statistical analysis.**

Statistical analysis was performed using GraphPad<sup>TM</sup> Prism 5 software. Data were analyzed by Anova, Student's t-test or Wilcoxon test. Only P-values ≤0.05 were considered statistically significant data are expressed as median with interquartile range or mean with SEM.

## Results

### **The tumor microenvironment induced CD146 expression in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.**

CD146 expression in immune cells was previously reported to be increased in inflammatory conditions [15, 20, 23-25], but its expression on tumor infiltrating immune cells remains unknown. Therefore, we first evaluated the expression of this CAM in immune cells from cancer patients (CP).

First, CD146 expression was quantified by flow cytometry in PBMC from healthy donors (HD) and compared to PBMC from kidney, lung and breast CP (**Figure 15 A**). We observed similar levels of CD146 expression in both HD and CP regardless of tumor type and immune cell subpopulation.

From CP tumor and tumor-adjacent tissue (TAT) samples, we then evaluated CD146 expression in CD45<sup>+</sup> immune cells infiltrating these tissues (tumor infiltrating immune cells - TIIC and tumor-adjacent tissue-infiltrating immune cells - TATIIC) (**Figure 15 B**). In CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B lymphocytes, the proportion of cells expressing CD146 was increased in tissues compared to PBMC. Interestingly, CD146 expression was highest in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes compared to other subpopulations, with more than 15 % of these cells positive in TATIIC (mean expression in kidney TATIIC: 17.76 % ± 2.94 %; in lung TATIIC 22.59 % ± 1.57 %), with an increased frequency of CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> in TIIC (mean expression in kidney tumors 24.85 % ± 2.15 %; in lung tumors 29.38 % ± 2.67 %; in breast tumors 16.79 % ± 2.95 %) compared to TATIIC.

These results shown that the frequency of immune cells expressing CD146 appears higher in tissues when compared to PBMC, with preferentially high expression in CD4<sup>+</sup> T cells.

### **Tumor cells induce CD146 expression in immune cells.**

Considering the low expression of CD146 in lymphocytes from PBMC compared to TIIC, we questioned whether TIIC CD146 expression may be induced by the tumor microenvironment.



To evaluate the influence of tumor cells on CD146 expression in immune cells, we performed direct co-culture assays with PBMC from HD with kidney (KTCL-140 or A-498) and breast (MDA-MB-231 or MCF7) tumor cell lines constitutively-expressing or lacking CD146 (**Figure 16A**) to evaluate the importance of homotypic interactions.

We demonstrate that in absence of activation, tumor cell lines expressing CD146 (KTCL-140 and MDA-MB-231) were more proficient in inducing CD146 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells (**Figure 16B**) and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes (**Figure 21A**). Interestingly, PBMC activation by anti-CD3/CD28 antibodies induced a CD146 expression increase by more than 10-fold in CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells (**Figure 16C**) and in CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells (**Figure 21B**) compared to non-activated cells and in presence of all tumor cell lines. This induction was amplified independently of initial CD146 expression.

To investigate the mechanism employed by tumor cells to induce CD146 expression, we performed an *in vitro* 3- $\mu$ m pore membrane Boyden transmigration assay in which freshly CD146-depleted PBMC were seeded in the top chamber and tumor cells were placed to the lower chamber. Given that KTCL-140 kidney cancer cells were most efficient in inducing CD146 expression in co-culture assays (**Figure 16**), we chose to focus on this cell line for subsequent experiments.

After 24h of transmigration, we evaluated the phenotype of migrating and non-migrating CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (**Figure 16D, E**) and CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (**Figure 21C, D**) T cells by flow cytometry. We observed that, in absence of tumor cells in the lower chamber, CD146 expression levels remained the same among migrating and non-migrating cells in both activating and non-activating conditions. However when KTCL-140 were added to the lower chamber, migrating immune cells (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>; **Figure 16D, E**; CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>; **Figure 21C, D**) presented a significant increase of CD146 expression independently of their initial activation by anti-CD3/CD28.

Taken together, these results suggest that CD146 acts as an activation marker in immune cells. However, in absence of activation, we suspect a role for homotypic interaction in CD146 induction. And CD146 induction in immune cells by KTCL-140 tumor cells may require cell contact.

### **CD146 expression is induced by necrosis.**

Levels of CD146 expression varies within a population of immune cells. We therefore evaluated clinico-pathological data to establish correlations between CD146 expression and tumor parameters. Given the heterogeneity between tumor types, we chose to focus on clear cell renal cell carcinoma (CCRCC), which represented the vast majority of kidney tumors in our study. Interestingly, kidney tumors highly expressing CD146 among infiltrating CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells presented the highest necrotic score based on pathology reports (**Figure 17 A**). Importantly, we confirmed that CD146 was not induced by the lack of oxygen (data not shown).

Therefore, to decipher the role of necrosis on leukocyte CD146 expression, we will focus on kidney cancer cells since they induce CD146 expression in immune cells in transmigration assays. We evaluated the *in vitro* effect of necrotic KTCL-140 and A-498 cells on CD146 expression in immune cell co-culture assays.

Freshly CD146-depleted HD PBMC were co-cultured during 3-day “heat” or “cold” thermally-shocked necrotic KTCL-140 or A-498 (**Figure 22 A-B-C**) in activating (medium supplemented with anti-CD3, -CD28, IL-2) or non-activating conditions (medium added with IL-2).

Interestingly, whereas necrotic A-498 were unable to induce CD146 expression in immune cells (**Figure 23**), in presence of KTCL-140 and in activating conditions (**Figure 17 B, D**), we observed an increased proportion of cells expressing CD146 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (**Figure 17 B**; without KTCL-140: 10.59 % ± 4.18 %, with KTCL-140: 24.19 % ± 4.60 %) and in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (**Figure 17 D**; without KTCL-140: 19.06 % ± 6.24 %, with KTCL-140: 35.25 % ± 3.71 %) after 48 hours of co-culture. This proportion reached 60.17 % ± 9.94 % of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and 75.10 % ± 6.38 % of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> following after 72 hours of co-culture with cold-shocked KTCL-140 and 46.72% ± 11 % of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and 68.46% ± 3.61 % of CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> with heat-shocked KTCL-140 compared to cells cultured without KTCL-140 in which the expression of CD146 reached 31.68% ± 4.85 % of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and 42.01% ± 6.45 % of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.

In non-activating conditions (**Figure 17 C**), co-culture with tumor cell lines for 72h induced a significant increase of CD146 expression (without KTCL-140 : 3.48 %  $\pm$  0.56 %, with KTCL-140 : 8.82 %  $\pm$  1.78 %).

Taken together, these results demonstrate that certain types of necrotic tumor cells may have an increased capacity to induce CD146 in immune cells.

### **Characterization of CD146<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes infiltrating tumors (TIL).**

Tumors are infiltrated by immune cells (TIIC), which often present a phenotype and functions which may differ from circulating PBMC.

In human cancer patients, PBMC, TATIIC and TIIC, CD146 cells were mainly represented by CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (24-62 %) (**Figure 18 A**), 6-15 % were CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, 2-10 % were CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> B lymphocytes and less than 5 % were CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. Myeloid origin CD3<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> cells were weakly represented amongst CD146-positive PBMC of cancer patients (less than 8 %), although we noted a significantly- increased frequency in tissues, particularly in TIIC from kidney tumors and in TATIIC from lung tumors. However, when fractioning CD146-expression of CD45<sup>+</sup> kidney TIIC into low, intermediate and high intensity (**Figure 18 B**), we observed that CD3<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> cells were mainly represented in CD146<sup>low</sup> cells (49.81 %  $\pm$  12.01 %) while this proportion decreased to 14.28 %  $\pm$  6.59 % amongst CD146<sup>high</sup> and represented 36.99 %  $\pm$  11.86 % of CD146<sup>int</sup>. Interestingly, CD146<sup>high</sup> were mostly CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (45.49 %  $\pm$  5.94 %) (**Figure 18 C**). We thus chose to characterize CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes (TIL) further.

In order to better characterize this CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> lymphocyte subpopulation, we performed gene expression profiling on TIL from three kidney tumors (**Table 5**). TIL were sorted into two subpopulations: CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> (CD146<sup>+</sup>) and CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD146<sup>-</sup> (CD146<sup>-</sup>). Following microarray analyses, gene expression ratio between these two populations was evaluated by selecting genes presenting a fold change of greater than 2 between CD146<sup>-</sup> and CD146<sup>+</sup> and consistent in all three patients samples (**Figure 24**). Among these genes, 78 were found to satisfy these criteria, with 339 genes being modulated in two of three patients, including 140 upregulated (**Table 7**), and 191 downregulated genes (**Table 8**) in CD146<sup>+</sup> TIL. As expected and as a control, the greatest

differential between populations was observed in CD146 gene expression was observed with CD146<sup>+</sup> population.

We performed Ingenuity Pathway Analysis<sup>TM</sup> (IPA) to identify genes involved in the inflammatory response. Interestingly, among genes upregulated in CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> TIL, we identified multiple genes classically associated to Treg phenotype and immunosuppressive function (**Table 6**).

In order to confirm our results, these CD146<sup>+</sup> and CD146<sup>-</sup> cells were further characterized by flow cytometry for CD25, Foxp3, CD39, IFN- $\gamma$ , and IL-17A expression (**Figure 19**). Although previous studies successfully linked the expression of CD146 to Th17 cells in HD and in autoimmune diseases, [15, 20, 24, 25], flow cytometry analysis of freshly-sorted TIL highlighted only a small fraction of CD146<sup>+</sup> cells that secreted IL-17A (kidney 2.65 %  $\pm$  1.40 %, lung 1.53 %  $\pm$  0.36 %) following 16 hours of activation with PMA/ionomycin (**Figure 19 B**). Even if they were more IL-17A<sup>+</sup> cells was increased among CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells, this subpopulation was not sufficiently prevalent in our model to warrant further study.

As previously demonstrated in MS, we confirmed that IFN- $\gamma$  expression was similar both in CD146<sup>+</sup> (kidney 41.21 %  $\pm$  5.74 %, lung 28.36 %  $\pm$  3.18 %) and CD146<sup>-</sup> subpopulations (kidney 29.91 %  $\pm$  4.72 %, lung 30.26 %  $\pm$  9.94 %) (**Figure 19 B**).

In accordance with microarray data,, CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells were increasingly represented in CD146<sup>+</sup> cells (kidney 22.26 %  $\pm$  4.09 %, lung 17.49 %  $\pm$  3.18 %, breast 24.32 %  $\pm$  2.74 %) compared to CD146<sup>-</sup> cells (kidney 3.22 %  $\pm$  0.61 %, lung 9.07 %  $\pm$  1.91 %, breast 7.08 %  $\pm$  2.03 %) by flow cytometry (**Figure 19 C**). This subpopulation was 7-fold enriched in CD146<sup>+</sup> TIL from kidney cancers. Next, we also confirmed the higher expression of the ectonucleotidase CD39 in kidney (CD146<sup>+</sup>: 58.22 %  $\pm$  11.10 % CD146<sup>-</sup>: 33.81 %  $\pm$  10.69 %) (**Figure 19 D**) and lung (data not shown) TIL.

We then compared the intensity of CD25 and Foxp3 expression (mean fluorescence intensity: MFI) in each population. We found that CD25<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> were enriched in CD146<sup>+</sup> cells (**Figure 20 A-B**).

Other studies have reported the importance of CD39 and CD73 ectonucleotidases in Treg suppressive function [26-28]. Furthermore, when we compared CD39 expression in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells to CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD146<sup>-</sup> cells, we observed that CD146<sup>+</sup> cells were almost exclusively CD39<sup>+</sup> (CD146<sup>+</sup>: 95.02 % ± 2.72 % and CD146<sup>-</sup>: 86.80 % ± 8.94 %), furthermore the intensity of CD39 expression was higher in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells (mean MFI: 10718 ± 1209 compared to 5353 ± 1021 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD146<sup>-</sup> cells) (**Figure 20 C**).

Finally, because CD127/IL-7R $\alpha$  expression was demonstrated as being inversely correlated with suppressive function of human CD4<sup>+</sup> Treg cells [29], we evaluated CD127 expression in both populations. We demonstrated that the frequency of CD127 was slightly increased amongst CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells although MFI was identical in both populations (**Figure 20 D**).

Lastly, since Treg are best defined by their capacity to suppress T cell functions, *in vitro* T cell suppression assays were performed with CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> cells sorted from lung tumor cell suspensions based on CD146 expression, and showed that CD146<sup>+</sup> cells did, in fact, display a capacity to suppress cell proliferation (**Figure 20 E**).

In summary, intra-tumoral CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> TILs are enriched in tumors, appear to display Treg attributes and actively suppress T cell proliferation.

## Discussion

Human tumors are a complex and heterogeneous mix of cells with deploy a variety of mechanisms attracting and polarizing immune cells towards a pro-tumor phenotype. In this study, we investigated the enrichment and the role of a CD146<sup>+</sup> population of immune cells in kidney, lung, and breast tumors. We demonstrated that CD146 is preferentially expressed on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, despite being detectable in multiple immune cell populations. Furthermore, we showed that CD146 expression in immune cells is induced by normal and necrotic tumors cells. Interestingly, this tumor-enriched CD146<sup>+</sup> immune cell population presented a Treg-like profile based on microarray analysis, flow cytometry assessment of CD25, FoxP3, and CD39 expression, and capacity to suppress T lymphocyte proliferation. CD146<sup>+</sup> tumor-infiltrating immune cell constitute a new cell population having yet to be described in the context of human cancers.

In the blood of HD, CD146 was previously described to represent a small, but distinct population of activated CD4 T lymphocytes presenting an effector memory phenotype [13, 14]. Subsequent characterization determined their Th17 polarization through co-expression of CD161, CCR4, CCR6, production of IL-17A, granzyme B, IL-22 and GM-CSF. Induction of mRNA transcripts was also specifically associated with Th17 phenotype due to increases in IL-17A, RORC2, ROR- $\gamma$ , CCR-6, aryl hydrocarbon receptor (AHR), Runx-1, CXCL-13, IL-21, IL-22, IL-23R, IL-26, and GM-CSF [15, 24, 25]. CD146 expression in leucocytes was previously reported to be increased in the blood [15, 24, 25], synovial effusions [23], and cerebrospinal fluid [15, 20] of patients suffering from inflammatory diseases, and has been found in Th17 lymphocyte populations. Our current data indicate that, contrary to autoimmune diseases, PBMC of cancer patients display identical levels of CD146 expression in comparison to HD. However, our study confirms that CD146 is predominantly expressed in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in the blood, tumor-adjacent tissues and tumors of cancer patients. Our data demonstrate a distinct immunophenotype and gene profile of immune cells expressing CD146 in tumors. In agreement with previous studies carried out in autoimmune diseases, CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> TIL displayed a particular gene profile with genes association to Th17 genes (IL-7, RORC, CLEC7A, IL1R1 and TNFRSF8), although strikingly, in our study, we also found genes linked to a Treg-like signature (CD274 (PD-L1), ENTPD1 (CD39), FOXP3,

IL2RA (CD25), IKZF2 (HELIOS), IKZF4 (EOS)). Furthermore, phenotypic analyses showed that despite identifying a proportion of CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells secreting IL-17A following PMA/Ionomycin activation, the predominant population of CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells was expressed CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg markers as well as the immunosuppressive ectonucleotidase CD39.

Despite reports describing a Th17 phenotype linked to CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> involved in transmigration through the BBB in MS [15], our study identifies an enrichment of Treg-like immune cells in the context of cancer. This distinction is not surprising considering the contradictory immunological basis of these immunological diseases, with MS resulting from over-activation of immune cells, and cancer from immune-suppression. In fact, certain studies suggest Th17 cells recruitment could prove detrimental to tumors directly and by contributing to recruitment of anti-tumor, Th1 cells [30]. However, recruitment of Treg-like, suppressive CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> T lymphocytes, and enhanced induction of these cells, may be beneficial to tumors by promoting establishment of an immunosuppressive microenvironment often detected in cancers. CD146 expression by immune cells may therefore promote tumor progression through these two general mechanisms. Further studies are underway to better define the behavior of CD146 immune cells in vivo. Finally, the plasticity demonstrated between Th17 and Treg may also go some way in explaining discrepancies between their profiles in cancer and autoimmune disease. Treg and Th17 are extremely plastic [31, 32], which may suggest Treg cells present in our analyses may be in the process of converting to, or from Th17 cells. However, demonstration of the suppressive activity of CD146<sup>+</sup> cells, confirms that the CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells detected in our tumors samples are, in fact, Treg.

Previous reports have evoked cytokines such as IL-23 [15], IL-2 [13], TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  [33, 34], IL-13 [35] and growth factors such as TGF- $\beta$  [36] or AMPc [37], as inducers of CD146 expression in multiple cell types. Most of these molecules are present in the tumor microenvironment, and are either produced or induced by tumor cells. Accordingly, we have proven that a necrotic environment similar to that generated in sizeable tumors, possesses an increased capacity to induce CD146 expression (**Figure 17 A**). Importantly, we confirmed that CD146 was not induced by the hypoxic environment similar to what is found in necrotic tumors (data not shown).

The secretome of necrotic tumor cells is rich in pro-inflammatory and pro-angiogenic factors such as FGF, TGF- $\beta$ , PDEGF, G-CSF, and others such as VEGF [38, 39].

Interestingly, VEGF has been shown to require signaling through both its receptor VEGFR-2, and its co-receptor CD146, suggesting a role for CD146 in promoting tumor angiogenesis by allowing downstream signaling and blood vessel formation through the p38 MAPK and AKT signaling pathways [11]. Accordingly, lymphocytes may exploit CD146 as a way of infiltrating tumors, considering the work of Mesri et al. which reported an upregulation of CD146 in tumor endothelium [40] and implication of CD146 has been implicated in melanoma cell invasiveness [41, 42], in lymphocyte rolling, adhesion and migration across endothelial cells [16, 18] and in the adhesion and migration of Th17 lymphocytes across the BBB [15, 17].

Tumors may be preferentially induced by tumors in immunosuppressive cell populations to increase the ability of such cells to reach its core and to generate an immunosuppressive, pro-tumoral microenvironment.



## **Conclusion**

In summary, our data support that CD146 might be an important factor for lymphocyte migration and could favor immunosuppression. Better characterization of this immune cell population *in vivo* may help gain a better understanding for the complex tumor microenvironment and the implications of necrosis on immune cell populations in order to promote success of cancer immunotherapies.

## **Acknowledgments**

Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), affiliated to the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). We kindly thank Stephanie Lepage and Louise Rousseau for the management of clinical samples and databases. Thanks to Vicky Thiffault for her help in collecting lung cancer samples. Thanks to Euridice Carmona for her help for IPA™ analysis. Thanks to Laïla-Aïcha Hanafi for her advice for the figures design and Anne Monette for her help in reviewing this article.

JFC holds the Claude-Bertrand Chair in Neurosurgery from Université de Montréal. JFC also holds a FRQ-S Junior 2 fellowship. RL holds a Senior FRQ-S fellowship.

## Tables and figures

Patient	Age	Sexe	Fuhrman degree	TNM Stage	Tumor histology
K1	19	M	4	T2aNxMx	Unclassifiable RCC
K2	62	M	3	T1aNxMx	Type 2 PRCC
K3	68	M	3	T3aNxMx	CCRCC
K4	62	F	2	T3aNxMx	Type 1 PRCC
K5	29	M	2	T1bNxMx	CCRCC
K6	80	F	2 with 3	T1NxMx	CCRCC
K7	54	M	3	T1aNxMx	Type 2 PRCC
K8	69	M	4	T3aN0Mx	CCRCC
K9	61	F	2	T3aNxMx	CCRCC
K10	61	M	3 with 4	T2aNxMx	Unclassifiable RCC
K11	74	F	2 with 3	T1aNxMx	CCRCC
K12	57	M	4	T3aNxMx	CCRCC
K13	37	M	3 with 4	T3aNxMx	CCRCC with unclassifiable RCC areas
K14	54	M	3 with 4	T3aNxMx	CCRCC
K15	64	M	2 with 3	T1bNxMx	CCRCC
K16	71	M	2	T1aNxMx	CCRCC
K17	69	M	2 with 3	T1aNxMx	CCRCC
K18	65	M	3	T3aNxMx	CCRCC
K19	73	M	3	T3aN0Mx	Type 2 PRCC
K20	68	M	3	T1bNxMx	CCRCC
K21	54	F	2	T1aNxMx	CCRCC
K22	62	F	2	T2aNxMx	CCRCC
K23	71	F	3	T3aNxMx	CCRCC with Sarcomatoid changes
K24	73	F	2	T3aNxMx	CCRCC
K25	58	F	4	T3aNxMx	CCRCC with Sarcomatoid changes
K26	62	F	3 with 4	T3bN0M1	CCRCC
K27	59	F	2 with 3	T3aNxMx	CCRCC
K28	62	M	3	T3aNxMx	CCRCC
K29	55	M	4	T1bNxMx	CCRCC
K30	70	F	3 with 4	T2NxMx	CCRCC
K31	57	F	4	T3NxMx	Unclassifiable RCC

**Tableau 2 (1<sup>mII</sup>) : Characteristics of kidney cancer patients.**

Tissues from 31 kidney cancer patients were used for this study. This table presents clinico-pathological information such as patient age, sex (M: male, F: female), Fuhrman nuclear degree [43], tumor-node-metastasis (TNM) stage [44] and tumor histology (RCC: renal cell carcinoma, CCRCC: clear cell renal cell carcinoma, PRCC: papillary renal cell carcinoma).

<b>Patient</b>	<b>Age</b>	<b>Sexe</b>	<b>Stage</b>	<b>TNM Stage</b>	<b>Tumor histology</b>
L1	53	F	1B	T2aN0M0	Non differentiated Adenocarcinoma
L2	64	M	1B	T2aN0M0	Bronchioloalveolar Adenocarcinoma
L3	63	M	2B	T3N0M0	Epidermioïd Carcinoma
L4	67	F	4	T2aN0M1a	Bronchioloalveolar Adenocarcinoma
L5	75	M	2B	T2bN1M0	Papillary Acinar Adenocarcinoma
L6	78	F	3A	T2aN2M0	Acinar Adenocarcinoma
L7	65	M	4	T1bN0M1b	Non differentiated Adenocarcinoma
L8	79	F	1B	T2aN0M0	Papillary, Acinar Adenocarcinoma
L9	68	M	1B	T2aN0M0	Bronchioloalveolar, Acinar Adenocarcinoma
L10	64	M	3B	T4N2M0	Papillary Acinar Adenocarcinoma
L11	64	M	2A	T1aN1M0	Papillary Adenocarcinoma
L12	79	M	3A	T3N1M0	Epidermioïd Carcinoma
L13	64	M	1B	T2aN0M0	Non differentiated Adenocarcinoma
L14	74	F	1B	T2aN0M0	Malpighien Carcinoma
L15	60	F	1A	T1aN0M0	Malpighien Carcinoma
L16	80	M	1B	T2aN0M0	Epidermioïd Carcinoma
L17	63	F	2B	T3N0M0	Bronchioloalveolar Adenocarcinoma
L18	77	M	1A	T1aN0M0	Acinar Adenocarcinoma
L19	65	F	2B	T3N0M0	Sarcomatoid carcinoma
L20	72	M	1B	T2aN0M0	Acinar Adenocarcinoma

**Tableau 3 (2<sup>mII</sup>) : Characteristics of lung cancer patients.**

Tissues from 20 lung cancer patients were used for this study. This table presents clinico-pathological information such as patient age, sex (M: male, F: female), stage, tumor–node–metastasis (TNM) stage [44] and tumor histology.

Patient	Age	Sexe	Grade	TNM Stage	Tumor histology	Receptors statut ER/PR/Her2
<b>B1</b>	61	F	3	T2N1aM1	CCI and CIS	+/-/-
<b>B2</b>	59	F	3	T2N2aMx	CCI and CIS	+/-/-
<b>B3</b>	77	F	3	T2N1Mx	CCI and CIS	-/-/-
<b>B4</b>	70	F	3	T2N2Mx	CCI and CIS	-/-/-
<b>B5</b>	75	M	2	T2N0Mx	CCI and CIS	+/-/-
<b>B6</b>	79	F	2	T2N1aMx	CCI	+/-/-
<b>B7</b>	69	F	2	T2N1Mx	CCI and CIS	+/-/-
<b>B8</b>	64	F	2	T2N1aMx	CCI and CIS	+/-/-
<b>B9</b>	72	F	3	T2N2aMx	CCI	-/-/-
<b>B10</b>	84	F	3	T2N0Mx	CCI	-/-/-
<b>B11</b>	67	F	3	T2N1Mx	CCI and CIS	+/+/+
<b>B12</b>	50	F	3	T3N3aMx	CCI and CIS	+/-/-

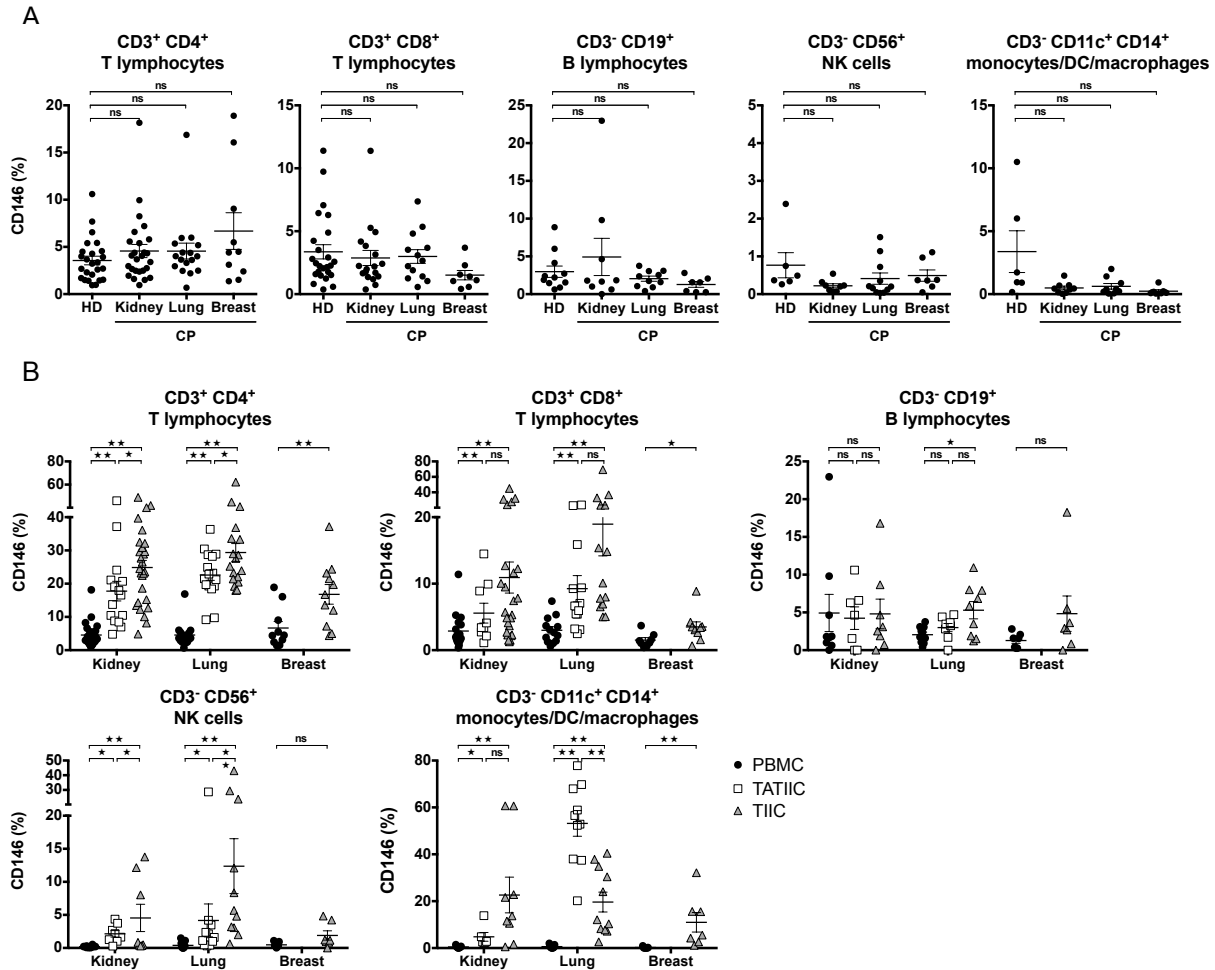
**Tableau 4 (3<sup>mII</sup>) : Characteristics of breast cancer patients.**

Tissues from 12 breast cancer patients were used for this study. This table presents clinico-pathological information such as patient age, sex (M: male, F: female), grade, tumor-node-metastasis (TNM) stage [44], tumor histology (CIS: carcinoma in situ, CCI : canalar carcinoma invasive) and estrogen (ER), progesterone (PR) and Her2 (ERBB2) receptor status.

Patient	Age	Sexe	Fuhrman degree	TNM Stage	Tumor histology
K34	69	M	4	T3aNxMx	CCRCC
K35	62	F	2	T1aNxMx	CCRCC
K36	56	M	3	T3aNxMx	CCRCC

**Tableau 5 (4<sup>mII</sup>) : Characteristics of the three kidney cancer patients selected for microarray gene analysis.**

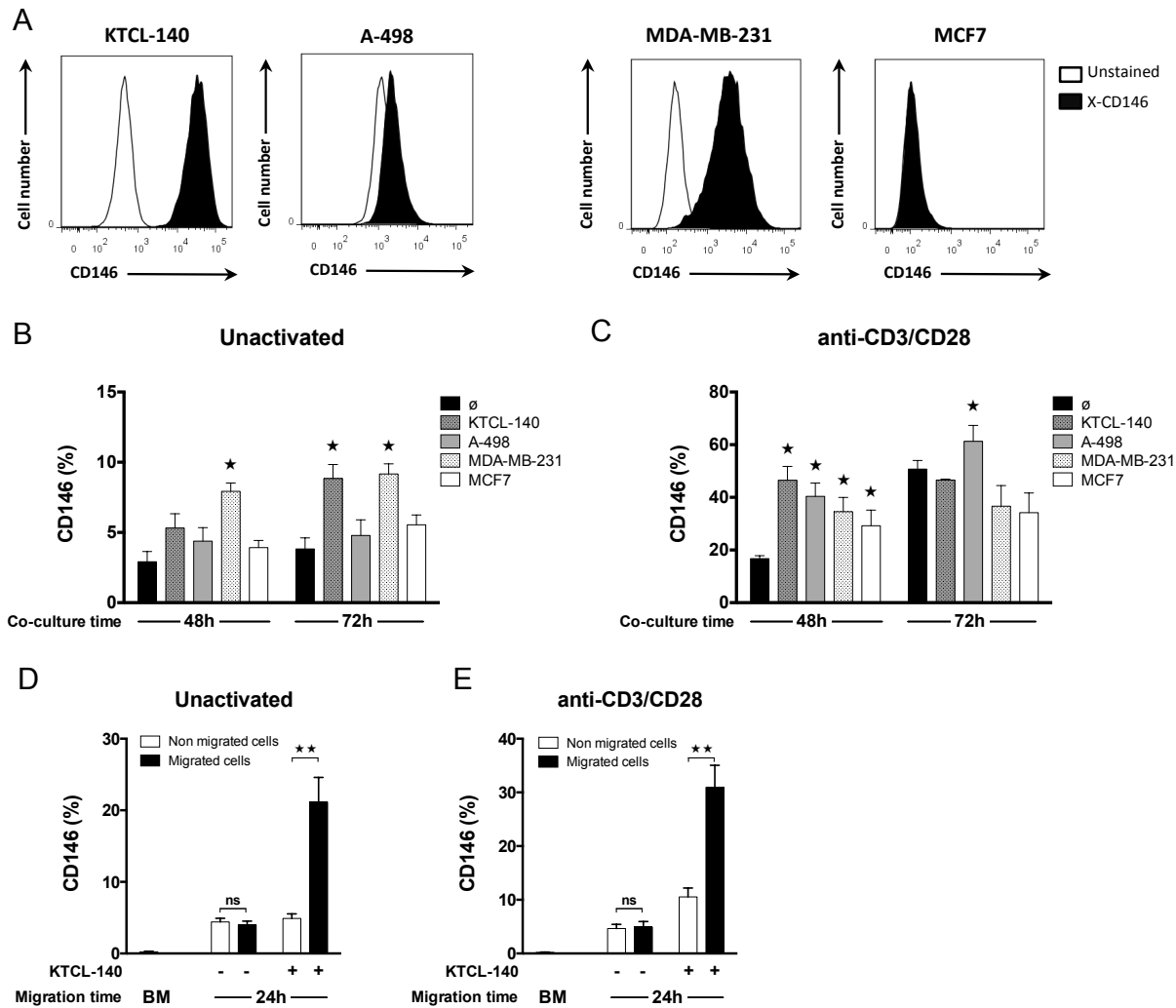
Gene microarray analysis was performed with CD45/CD3/CD4/CD146<sup>+</sup> and CD45/CD3/CD4/CD146<sup>-</sup> cells from tumors prepared from 3 kidney cancer patients. This table presents clinico-pathological information such as patient age, sex (M: male, F: female), Fuhrman nuclear degree [43], tumor–node–metastasis (TNM) stage [44] and tumor histology (CCRCC: clear cell renal cell carcinoma).



**Figure 15 (1<sup>mII</sup>) : CD146 expression in CD45<sup>+</sup> cells.**

Tumor and TAT from kidney (n=22), lung (n=15) and breast (n=10) cancer patient (CP) was disaggregated in a cell suspension by mechanical grinding using Medimachine™ [21]. Immune cells were sorted from tissue cell suspensions or from blood of the CP or healthy donors (HD) by centrifugation over a Leukocyte Separation Medium cushion. CD146 expression was determined by flow cytometry. (A) Represent the percentage of cells expressing CD146 in different subtype of immune cells of PBMC from HD and CP. (B) CD146 expression was determined in immune cells from PBMC, tumor (TIIC) and tumor-adjacent tissue (TATIC) from previous CP.

Error bars indicate mean±SEM ns=non-significant, \*P≤0.05, \*\*P≤0.01.



**Figure 16 (2<sup>mII</sup>) : Tumor cells induced CD146 expression in CD4 T lymphocytes.**

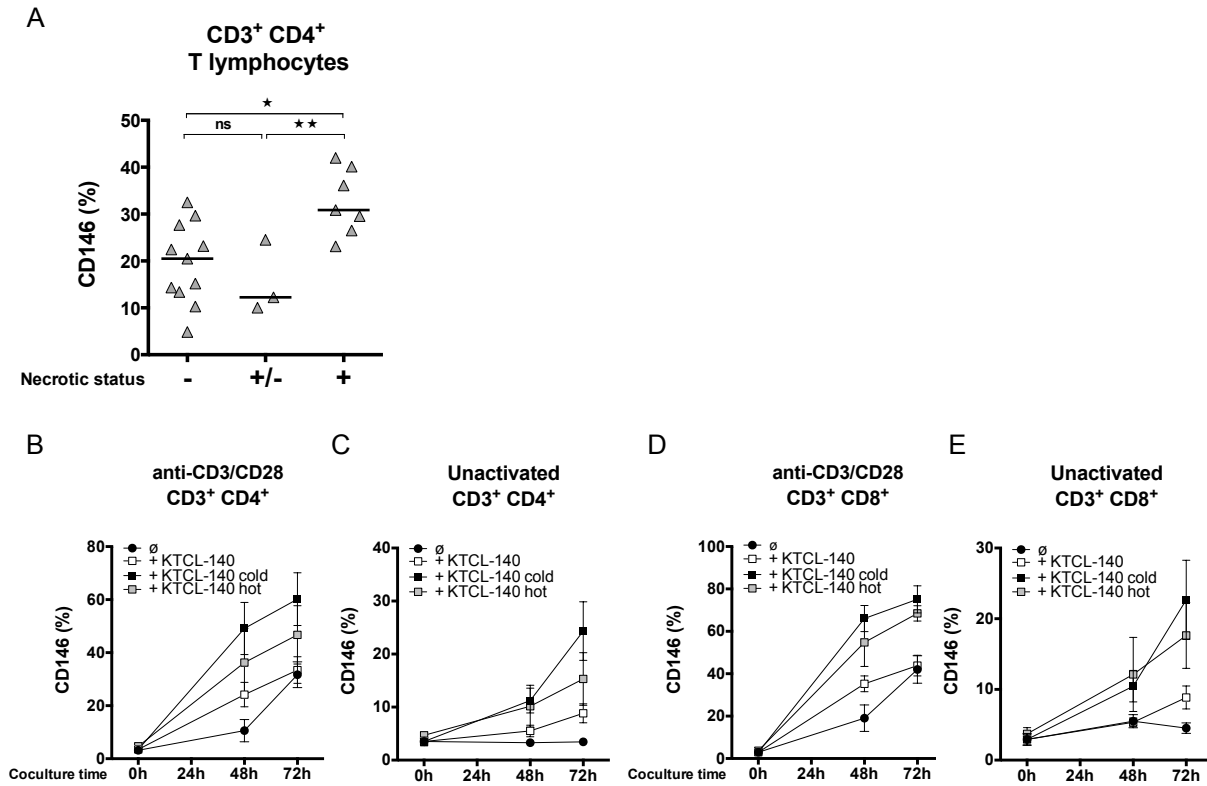
Co-culture assays were performed between in KTCL-140, A-498, MDA-MB-231 or MCF7 tumor cell lines ( $2.5 \times 10^5$ ) and PBMC from HD ( $n=3$ ;  $5 \times 10^5$ ) in activating (IL-2 + anti-CD3/CD28) or non-activating conditions (IL-2). Expression of CD146 was determined by flow cytometry in tumor cell lines. **(A)** CD146 induction was evaluated in  $CD3^+CD4^+$  T cells after 48 and 72 hours of co-culture without activation. **(B)** CD146 induction was evaluated in  $CD3^+CD4^+$  T cells after 48 and 72 hours of co-culture with anti-CD3/CD28 activation.

Freshly CD146-depleted PBMC ( $n=7$ ) were used in an *in vitro* transmigration assay using 3- $\mu$ m pore membrane Boyden chambers to evaluate the CD146 phenotype of migrated and non-migrated immune cells.

CD146-depleted PBMC ( $1.5 \times 10^6$ ) were added to the top chamber and allowed to migrate for 24 hours. The lower chamber contained medium with IL-2 **(C)** or with IL-2 and anti-CD3/CD28 **(D)** in presence or absence of KTCL-140 tumor cells ( $0.75 \times 10^6$ ). CD146 expression was determined by flow cytometry in  $CD3^+CD4^+$  before migration (BM) and after 24h in non-migrated and migrated lymphocyte populations.



Bars indicate the mean  $\pm$  SEM, \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.001$ .

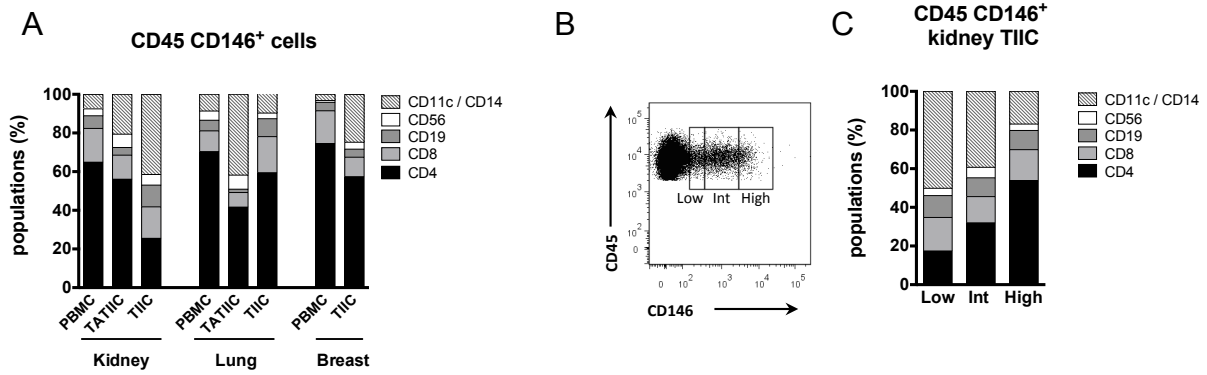


**Figure 17 (3<sup>mII</sup>): Necrotic kidney tumor cells induce CD146 expression in lymphocytes.**

(A) CD146 expression in CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was linked to necrosis status of CCRCC tumors. Pathologists determined score as + (visible necrosis), +/- (microscopic necrosis) or – (absence of necrosis). (B - G) To test the effect of *in vitro* tumor necrosis on immune cells, KTCL-140 were treated by thermal shock by either “cold” shock consisting of 5 freeze-thaw cycles of 5 min at -80°C and 37°C or “heat” shock consisting of 5 cycles of 5 min at 60°C and 4°C.

Three days of co-culture was performed between PBMC from 5 healthy donors (5X10<sup>5</sup>) and kidney tumor cell line KTCL-140 (2.5X10<sup>5</sup>) or KTCL-140 treated by “cold” or by “heat” thermal shock, in activating conditions (medium with anti-CD3, anti-CD28 and IL-2; B, D) or in non-activating conditions (medium with IL-2 only; C, E). Percentage of cells expressing CD146 was determined by flow cytometry among CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (B, C) and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (D, E) T lymphocytes following 48 and 72 hours of co-culture.

Bars indicate the mean ± SEM, ns= non-significant, \*P≤0.05, \*\*P≤0.01.



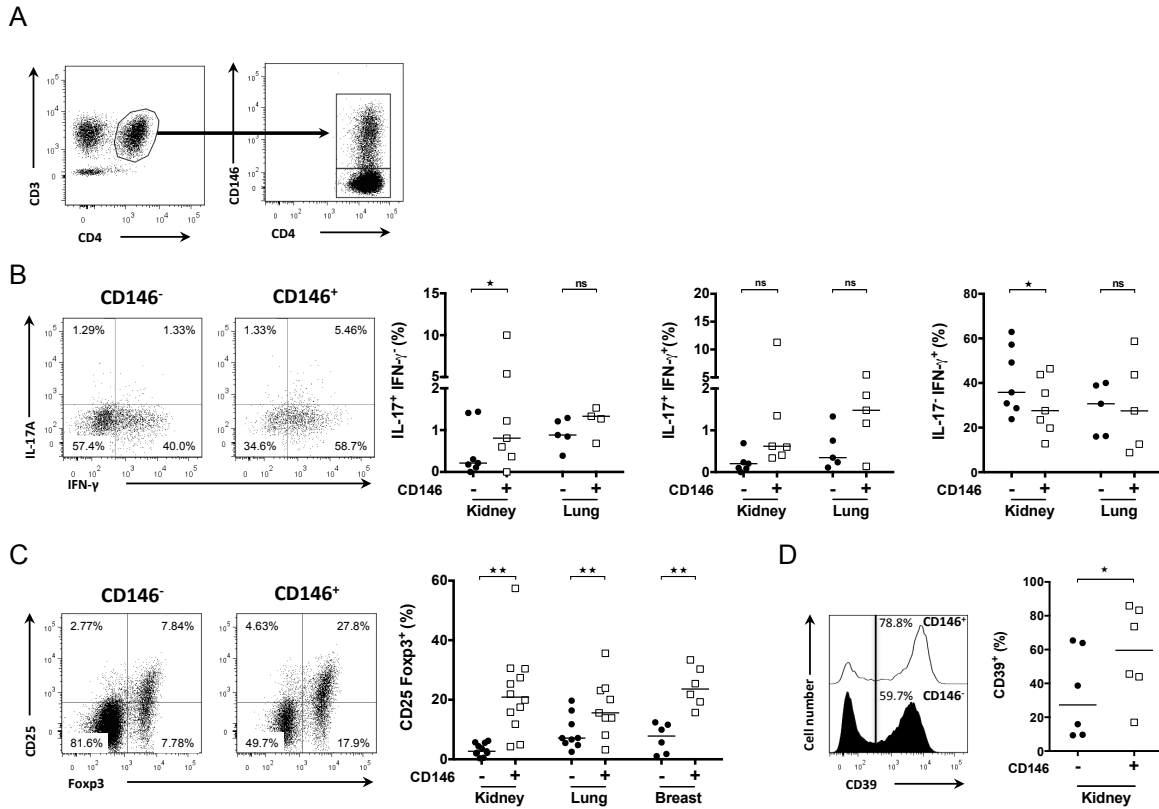
**Figure 18 (4<sup>mII</sup>) : Characterization of CD45<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> populations.**

(A) Immune subpopulations were characterized by flow cytometry from CD45<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> immune cells from PBMC, TIIC and TATIIC from kidney (n=22), lung (n=15) and breast (n=10) CP. Mean of each population is represented. (B) CD146 expression was divided according to low, intermediate and high expression of CD146 in kidney tumor TIIC. (C) Phenotype of CD146 TIIC in kidney tumors based on low, intermediate, and low expression of CD146.

Gene	Gene Name	Other name	Patient fold change			References
			K34	K35	K36	
<b>CD274</b>	CD274 molecule	PD-L1	2,21535	ND	2,395	[45] [46]
<b>ENTPD1</b>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	CD39	5,13894	5,59698	2,16615	[26, 27]
<b>IL2RA</b>	interleukin 2 receptor, alpha	CD25	2,05139	3,80454	3,01336	[47]
<b>FOXP3</b>	forkhead box P3		2,43707	4,95546	2,38428	[48]
<b>IKZF2</b>	Zinc finger protein Helios	Helios	2,89143	2,1576	2,34085	[49]
<b>IKZF4</b>	Zinc finger protein Eos	Eos	2,69245	ND	3,24501	[50]

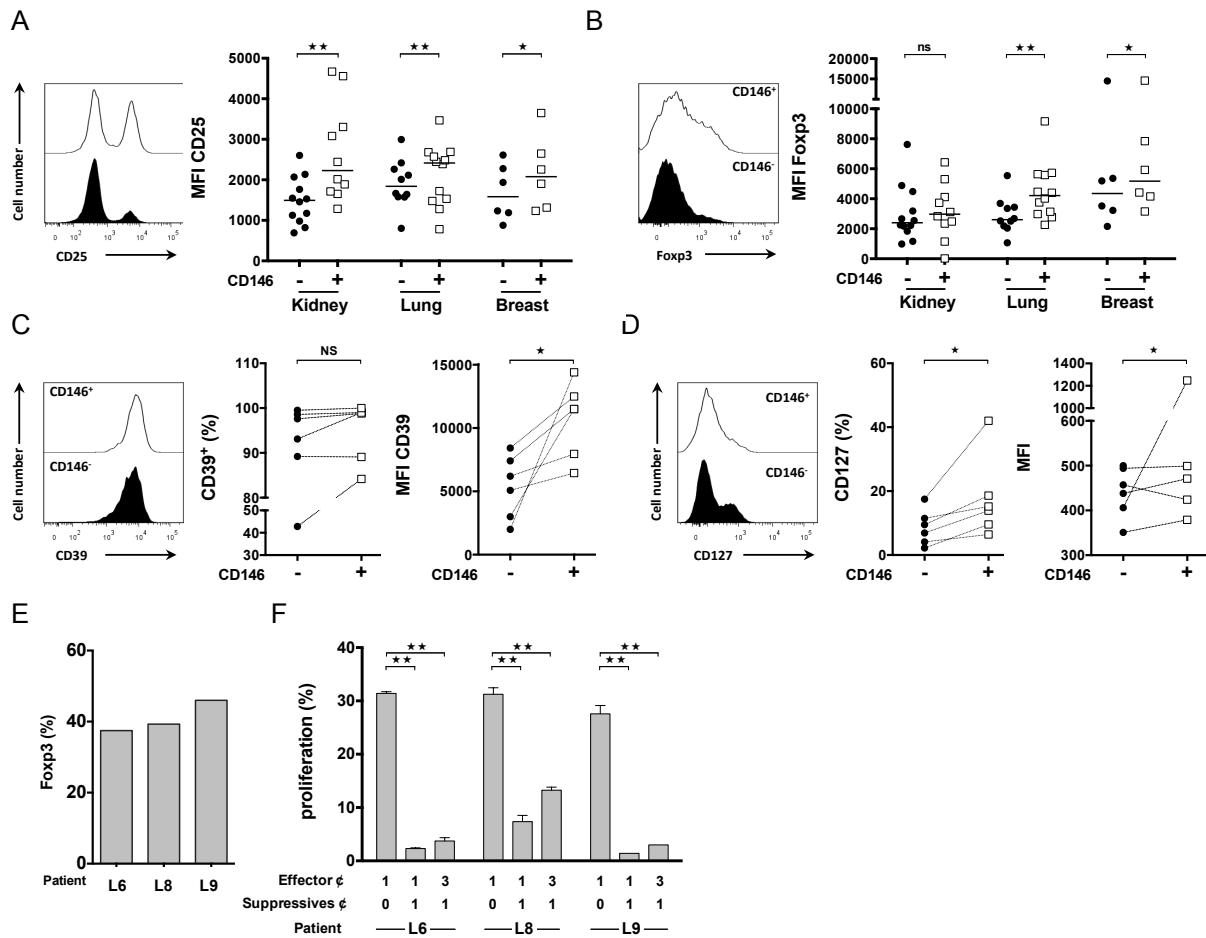
**Tableau 6 (5<sup>mII</sup>) : CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> TIIC have gene signature associated to Treg.**

Ingenuity Pathway Analysis<sup>TM</sup> (IPA) was performed on genes upregulated in CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> to identify genes involved in the inflammatory response. CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> genes linked with regulatory T cell (Treg) phenotypic and immunosuppressive characterization are presented in this table.



**Figure 19 (5<sup>mII</sup>): Characterization of CD4<sup>+</sup> TIL population according to CD146 expression.**

(A) Representative dot plot analysis for expression of CD146 TIL on CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. (B) IL-17A and IFN- $\gamma$  expression was determined in CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> (CD146<sup>+</sup>) and CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD146<sup>-</sup> (CD146<sup>-</sup>) TIL of 6 kidney and 5 lung tumors after an 16 hours activation with PMA and ionomycine in the presence of BFA (see methods). (C) Percentage of CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells was determined in both CD146 freshly isolated TIL populations from 12 kidney, 9 lung and 6 breast tumors as indicated in the representative dot plot and in the compilation graph. (D) Similar analysis as done in C to determine CD39 percentage in TIL from 6 kidney tumors. Bars represents mean ns= non-significant, \*P $\leq$ 0.05, \*\*P $\leq$ 0.01.

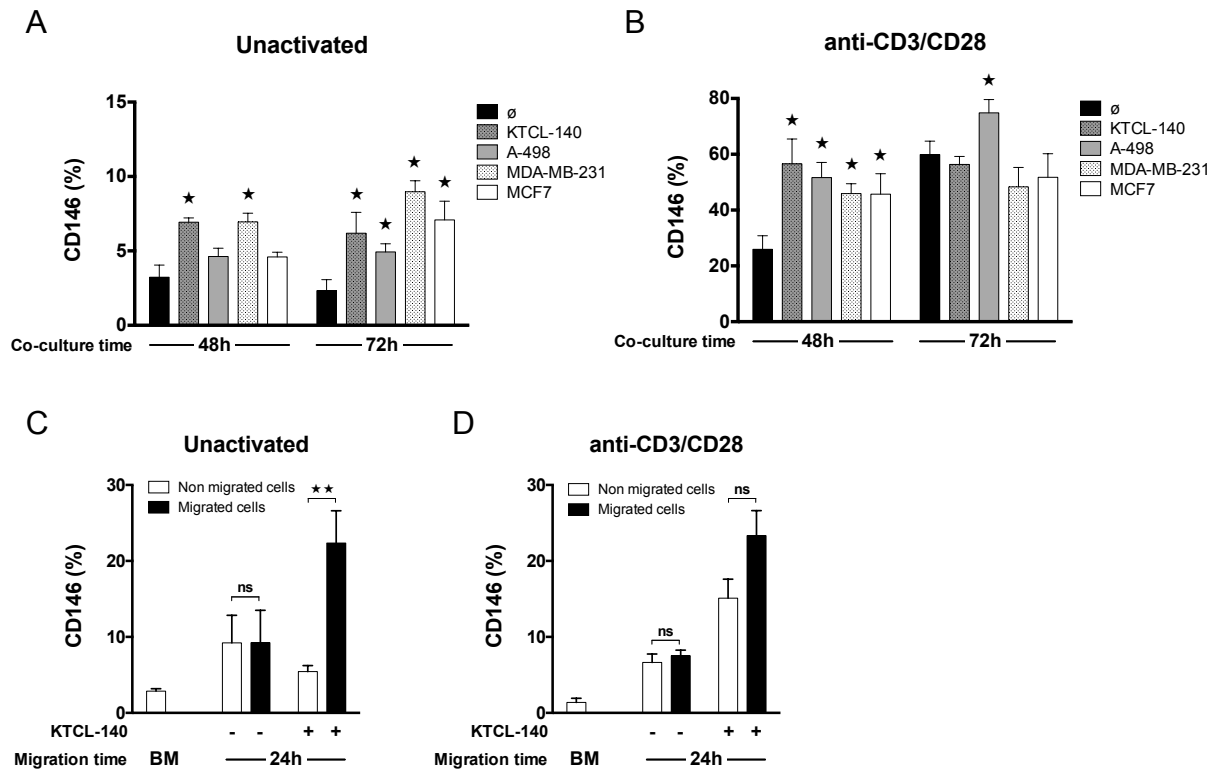


**Figure 20 (6<sup>mII</sup>): CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> TIL are enriched in cells with an immunosuppressive profile.**

Mean fluorescence intensity (MFI) of CD25 (A) and Foxp3 (B) proteins have been determined by flow cytometry in CD4<sup>+</sup> CD146<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> cells from kidney, lung and breast tumors. Percentage and MFI of CD39 (C) and CD127 (D) population and their intensity of expression was determined in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD146<sup>-</sup> cells. (E, F) In a suppression assay, CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> CD146<sup>+</sup> (suppressor cells) and CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> (effector cells) T cells were sorted from 3 lung tumors. Percentage of Foxp3<sup>+</sup> cells in suppressor cells was determinate by flow cytometry (E). Effector cells were stained by CFSE and co-cultured with suppressive cells to a ration 1/1 or 3/1 in anti-CD3 pre-coated plates. Effector T cell proliferation was evaluated after 72 h (F).

Bars represents mean, ns= non-significant, \*P≤0.05, \*\*P≤0.01.

## Supplementary data



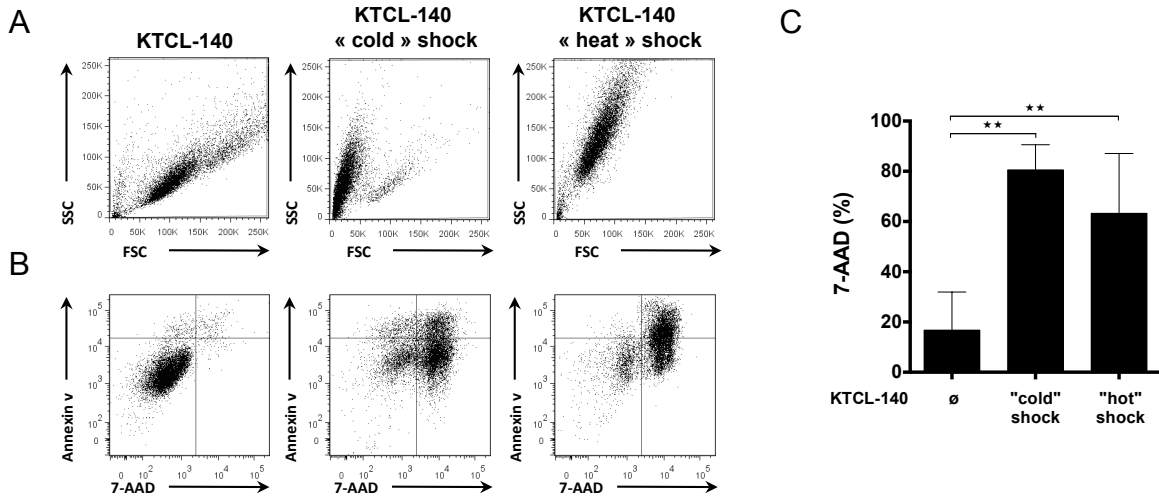
**Figure 21 (supplementary data 1<sup>mII</sup>): Tumor cells induced CD146 expression in CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.**

Co-culture assays were performed between in KTCL-140, A-498, MDA-MB-231 or MCF7 tumor cell lines ( $2.5 \times 10^5$ ) and PBMC from HD ( $n=3$ ;  $5 \times 10^5$ ) in activating (IL-2 + anti-CD3/CD28) or non-activating conditions (IL-2). (A) Expression of CD146 was determined by flow cytometry in tumor cell lines. (B) CD146 induction was evaluated in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells after 48 and 72 hours of co-culture without activation.

Freshly CD146-depleted PBMC ( $n=7$ ) were used in an *in vitro* transmigration assay using 3- $\mu$ m pore membrane Boyden chambers to evaluate the CD146 phenotype of migrated and non-migrated immune cells.

CD146-depleted PBMC ( $1.5 \times 10^6$ ) were added to the top chamber and allowed to migrate for 24 hours. The lower chamber contained medium with IL-2 (C) or with IL-2 and anti-CD3/CD28 in presence or absence of KTCL-140 tumor cells ( $0.75 \times 10^6$ ; D). CD146 expression was determined by flow cytometry in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> before migration (BM) and after 24h in non-migrated and migrated lymphocyte populations.

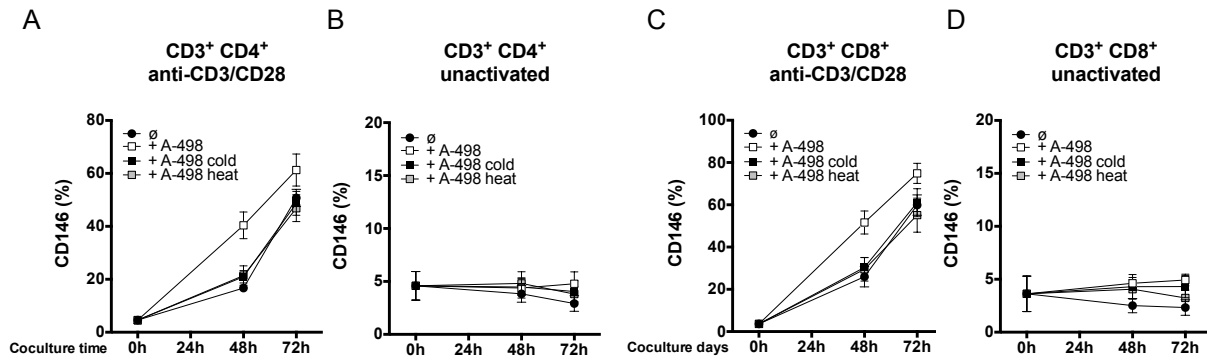
Bars indicate the mean  $\pm$  SEM, \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.001$ .



**Figure 22 (supplementary data 2<sup>mII</sup>): Effect of thermal shock on KTCL-140.**

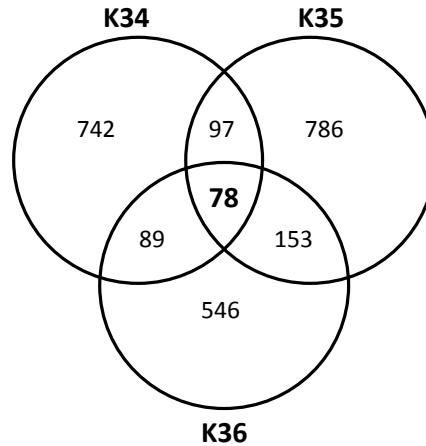
KTCL-140 was treated by thermal shock by either “cold” shock consisting of 5 freeze-thaw cycles of 5 min at -80°C and 37°C or “heat” shock consisting of 5 cycles of 5 min at 60°C and 4°C. In (A) the morphology of KTCL-140 cells was determined by flow cytometry following thermal shock. Necrotic status of cells was evaluated by 7-AAD and Annexin V stainings (B). (C) Depiction of the mean percentage of KTCL-140 7-AAD positive cells in 5 experiments.





**Figure 23 (supplementary data 3<sup>mII</sup>): Necrotic A-498 do not induced CD146 expression in immune cells.**

PBMC from 3 healthy donors ( $5 \times 10^5$ ) and kidney tumor cell line A-498 ( $2.5 \times 10^5$ ) or A-498 treated by “cold” or by “heat” thermal shock were co-cultured for three days, in activating conditions (medium with anti-CD3, anti-CD28 and IL-2; **A-C**) or in non-activating conditions (medium with IL-2 only; **B, D**). CD146 was determined by flow cytometry among  $CD3^+CD4^+$  (**A, B**) and  $CD3^+CD8^+$  (**C, D**) T lymphocytes after 48 and 72 hours of co-culture. Bars indicate the mean  $\pm$  SEM.



**Figure 24 (supplementary data 4<sup>mII</sup>): Genes similarly modulated among three studied kidney patient CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> TIL.**

TIL from 3 kidney tumor patients were sorted for CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> and CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD146<sup>-</sup>. RNA extraction and subsequent gene expression profiling was performed using *Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray*. Level of gene expression was compared in both populations and genes with a fold change  $\geq 2$  were selected and compared between patients. A total of 78 genes were commonly overexpressed in TIL of 3 patients.

Patient	Gene	Fold change			
		K34	K35	K36	
K34 - K35 - K36	MCAM	77,0248	17,2829	19,8003	*
	ATP10A	7,43898	6,4613	6,46576	
	CLNK	6,84515	4,83171	3,93973	
	CCR8	2,45904	8,20189	2,97664	*
	COL5A1	3,27296	5,49365	4,3995	
	ENTPD1	5,13894	5,9698	3,76615	*
	CD177	4,06744	5,47625	2,69617	
	NTN4	2,42584	4,81842	3,92392	
	ENPP1	2,63407	3,86291	4,51177	
	CABLES1	2,89071	4,16537	3,66348	
	CYP7B1	4,47806	2,39753	3,78772	
	METTL7A	3,11289	3,13808	4,3297	
	FAIM2	3,27043	4,3775	2,68767	
	ICA1	3,35936	3,94914	2,75255	
	LAYN	3,30073	3,06862	3,46449	
	FOXP3	2,43707	4,95546	2,38428	*
	TTBK1	3,05842	4,33235	2,23057	
	VAV3	2,23188	3,063	3,84319	*
	XLOC_006756	2,4785	3,10908	3,41431	
	LTK	2,45779	3,61814	2,86197	
	IL2RA	2,05139	3,80454	3,01336	*
	FAM164A	2,6792	3,36229	3,80579	
	IL1R1	2,46658	3,0083	3,36998	*
	FES	3,38834	3,10152	2,24127	*
	TNFRSF8	2,59552	3,29627	2,79857	*
	PLEKHG1	3,98985	2,4816	2,17377	
	PDE4D	3,5096	2,4859	2,64382	*
	FANK1	2,49998	3,21826	2,74713	
	PRKCDBP	2,41656	2,22495	3,22868	
	NIPAL4	2,7231	2,54974	2,57209	
	PTPLA	2,97115	2,38044	2,39716	
	IL7	2,10154	2,11235	3,52119	*
	PTGIR	2,73161	2,07719	2,68374	*
	IKZF2	2,89143	2,1576	2,34085	*
	MYO1E	2,60349	2,03051	2,63174	
	ADAM12	2,0172	2,92559	2,0612	*
	VDR	2,47923	2,07655	2,45274	*
	RTKN2	2,29714	2,29058	2,41386	
	PDE4A	2,21206	2,51607	1,1906	*
	ANK1	2,1168	2,3057	2,11716	
	STAM	2,19265	2,14223	2,08587	
	CLIC4	2,12652	2,51387	2,12652	*

Patient	Gene	Fold change	
		K34	K35
K34 - K35	FAM98B	2,07286	24,0343
	C3orf36	8,20294	5,54862
	FGF3	9,76584	2,23672
	CDK14	7,84521	3,72267
	ARHGAP42	7,63729	2,6716
	CASQ1	2,81055	7,39116
	FLJ40606	6,7357	2,07604
	SYT2	2,4782	6,04493
	LOC100133130	2,80022	5,6911
	FRY	2,57634	4,46087
	AH11	2,4574	4,27979
	CALML5	4,06693	2,60611
	LGALS12	3,48887	2,92098
	XLOC_009483	2,56672	3,58781

Patient	Gene	Fold change	
		K35	K36
K35 - K36	ATRX	10,8624	2,60491
	CGA	4,38652	8,64438
	DNAH8	4,64181	6,52611
	C14orf162	6,0343	4,91749
	PROK2	8,6501	2,01208
	ENPP3	2,93979	7,47416
	XLOC_005595	7,2284	2,22866
	PRO0471	2,36055	6,32215
	C10orf128	2,59574	5,56092
	FLJ45983	6,00316	2,97529
	CXCL9	3,32857	4,028
	IL1RL1	4,80884	2,41489
	P2RX6	2,53958	4,51163
	ESYT3	4,65017	2,18937
	RORC	4,51992	2,28535
	TBC1D8	3,81218	3,11596
	ZG16B	4,3165	2,37832
	LETM1	4,1249	2,2281
	CX3CR1	2,30712	3,96733
	IL1R2	3,30127	3,36697
	GFPT2	2,9333	2,81188
	KIAA1875	3,55604	2,04104
	FAM118A	3,34408	2,22299
	TTC28	3,02064	2,52338
	UTS2	3,14731	2,40178
	LAPTM4B	2,88347	2,61539
	RBM10	3,18142	2,24231
	HS3ST3B1	3,25358	2,18852
	POLR2J2	3,0872	2,31605
	LOC284454	3,09101	2,31688
	LAI2	2,37477	3,06209
	LOC283335	3,03696	2,29141
	GBP6	3,00877	2,17307
	CSF2RB	2,10816	3,1424
	CHRNA6	2,70741	2,24151
	RASAL1	2,4036	2,47367
	NCF4	2,74452	2,03712
	HPR	2,30237	2,46902
	CLIC4	2,12652	2,51387
	IL12RB2	2,30395	2,00007
	IRF5	2,04415	2,14146
	CARD17	2,00991	2,16926
	APOLD1	2,03571	2,02709

Patient	Gene	Fold change	
		K34	K36
K34 - K35	IL22	10,5042	4,550000
	MYOF	4,25895	7,03248
	TCF4	4,53271	4,0352
	SLC4A10	3,14227	5,99786
	SLC16A1	2,03273	6,61879
	TWIST1	4,31583	4,15306
	CSF2	5,05098	2,55541
	CTTNBP2NL	4,14641	3,40858
	GRIK1-AS1	2,07574	5,18074
	PIPSKL1	2,73271	4,16942
	CA2	3,25766	3,22247
	LINC00299	3,54535	2,85266
	CLEC7A	3,40907	2,90003
	TSPAN13	2,63242	3,47835
	IKZF4	2,69245	3,24501
	IL1RN	3,26971	2,6196
	COCH	3,46366	2,36939
	ECEL1	3,11095	2,46655
	IL4I1	2,69784	2,68615
	ACTG2	2,20092	3,13935
	HLF	2,28133	3,00552
	METTL15	2,19454	3,08455
	TMEM136	2,71135	2,48985
	MAGEH1	2,34498	2,84584
SOC2	2,00298	2,99247	
VWCE	2,40087	2,58164	
TBC1D4	2,3729	2,31287	
CD274	2,21535	2,395	
SGPP1	2,16024	2,24678	
CCDC50	2,24417	2,13936	
PLEKHIM3	2,30477	2,04943	
IL18R1	2,15187	2,10211	
GTF2I	2,03171	2,21525	
TMPPRSS3	2,02973	2,12963	

**Tableau 7 (supplementary data 5<sup>mII</sup>): List of genes up-regulated in CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>TIL.**

The microarray analysis identified 140 genes up-regulated in at least 2 of 3 kidney patient CD4 CD146<sup>+</sup> populations with a fold change  $\geq 2$ . Genes involved in inflammatory response according to IPA<sup>TM</sup> analyze are identified by a dot. ND: fold change  $\leq 2$ .

Patient	Gene	Fold change		
		K34	K35	K36
K34 - K35 - K36	PACSI1	4.95972	18.2996	24.6443
	TMEM155	7.82523	14.643	22.3632
	NKG7	5.33623	10.4985	13.8356
	KRT72	11.8737	8.56035	2.85214
	CCL4	2.02846	10.3143	10.5993
	AGAP1	2.51791	12.6544	7.6926
	CR1AM	3.8704	11.2643	7.30751
	GZMK	3.83922	7.61551	10.4183
	EOMES	4.07336	9.04612	6.58816
	PLEK	3.14555	12.0674	2.7263
	HAAO	8.09049	4.06305	3.94172
	CH3L2	2.81174	6.89918	5.62919
	IL37	6.33914	3.80507	5.15609
	SLAMF7	3.35257	7.94851	3.86389
	PPP2R3A	4.53052	3.6972	7.02765
	KIF23	8.84154	2.25204	2.62243
	AIF1	7.07376	2.80543	2.53445
	DLL1	2.83003	4.92952	4.40657
	HOXC4	2.58866	5.20932	3.58789
	DAB2IP	3.96328	3.27535	3.27859
	C17orf28	2.21514	2.72286	3.83987
	KANK1	2.57514	2.97151	2.72002
	TXK	2.42681	2.48174	2.86255
	CDH1	2.37961	2.28646	2.71609

Patient	Gene	Fold change	
		K34	K35
K34 - K35	NOG	25.5226	24.1441
	HSPG2	3.51013	38.9649
	FAM20A	11.7435	11.4466
	TEKT3	11.7681	8.69171
	LOC253044	5.71076	11.0188
	LOC100130169	8.29268	6.9945
	BMP10	6.82468	5.43609
	CC2D2B	7.61697	4.54346
	FZD6	5.15871	6.94069
	GPA33	9.78251	2.13847
	PRODH	6.3149	4.81426
	FBP1	4.96597	6.00917
	FHIT	7.16843	3.19104
	NR5A2	2.259	7.86176
	PLK1	7.28198	2.32404
	ACTN1	5.51443	3.76075
	NMNAT3	6.1317	2.72403
	TPA	5.06703	3.67593
	C1orf21	5.15096	4.37857
	ST8SIA3	4.10779	4.2302
	MYO1D	4.49024	3.7229
	C20orf132	5.52034	2.35713
	CYP2B6	2.60584	5.08497
	LYZL1	4.69511	2.82825
	KLHDC9	3.87664	3.56644
	ULK4	4.1145	2.13584
	C14orf132	3.91758	2.02161
	PDLIM1	2.89857	2.78312
	PLBD2	2.17343	5.50193
	SMAGP	2.60163	4.64767
	INSRR	3.61578	3.54524
	FAM27A	3.44509	3.53476
	KLHDC8B	2.32537	4.29748
	AGPHD1	2.65757	3.91617
	LOC100240735	2.26699	4.14682
	TTC16	3.69919	2.55548
	VWF	3.28992	2.92196
	LOC400236	2.87608	2.8943
	LOC100507547	2.57846	3.13357
	C9orf9	2.91102	2.75654
	HIST1H3H	3.01953	2.50659
	DKK3	2.46862	3.05689
	SIPR5	2.02544	2.52039
	DMRTC1	2.09734	2.39783
DBH	2.29569	2.13325	
CYP2U1	2.04303	2.11136	
FAM172BP	2.06119	2.05427	

Patient	Gene	Fold change	
		K35	K36
K35 - K36	PPP2R3B	5.7375	5.7375
	PP12613	52.8156	35.1585
	PECAM1	30.8782	23.9675
	CCL18	20.2113	8.2568
	THBS4	17.9115	6.30072
	GNB4	8.92762	14.533
	BTNL9	16.6482	5.57329
	ATP9A	16.2564	5.90705
	CCL3L3	8.41361	12.282
	CCL3	9.20457	9.46391
	IL10	13.739	3.71794
	NUAK1	5.39297	11.6303
	TTC24	7.62669	8.67765
	PLCG2	7.89945	7.75134
	SMPDL3A	5.65649	8.60579
	PON3	7.74298	6.38619
	RAMP1	4.90093	8.05856
	SETBP1	8.96497	3.77951
	CD244	4.19981	8.58774
	ZNF433	5.50679	6.10461
	LINC00087	2.43904	9.15156
	SHC2	4.71522	6.76368
	FAM108C1	2.5403	8.58004
	TIMD4	3.6347	7.30974
	FAM59B	4.47483	6.27197
	HAVCR2	5.99072	4.491
	PTRK2	4.79701	5.54471
	MCTP2	6.73349	3.5403
	BTNL8	2.6297	7.19029
	CKAP2L	6.13453	3.59677
	ENPP2	4.01029	5.65612
	GZMA	6.65312	3.05891
	HIF0	2.77061	6.79389
	VCAM1	4.10945	5.49027
	ENC1	4.59699	4.88643
	LAG3	5.37891	3.88915
	PIF1	5.69082	3.13487
	PHF21B	4.7713	3.88036
	FAM49A	3.31768	5.50546
	C20orf46	5.23225	3.32078
	TRO	2.41358	6.12868
	SPINK1	3.24869	5.2965
	ZWINT	2.24511	6.25972
	OR10H2	2.59059	5.72673
	SYCE3	4.63801	3.24133
	SPRY2	3.11556	4.58784
	C10orf58	2.70014	4.97889
	C6orf105	4.86716	2.00235
	FZD1	4.42324	3.06474
	FIGNL2	2.54013	4.90502
	CBFA2T3	3.41381	4.0366
	SFMBT2	4.44837	2.8985
	PTPN3	3.18597	4.15759
	GFOD1	2.85769	4.17941
	C1QB	2.15339	4.87929
	CCL27	3.47923	3.46036
	CD200R1	2.8312	4.04132
	MLF1	2.24245	4.60566
	UGT1A6	4.57231	2.18043
	TNNC2	3.25414	3.3896
	FGR	2.46527	4.08715
	TNFSF9	3.97889	2.29725
	IL6	3.65379	2.61051
	HAVCR1	3.5035	2.69744
	FCGR2A	2.42673	3.64388
	ALOX12P2	2.58419	3.4599
	LGR6	2.53705	3.36598
	VNN2	3.13218	2.58975
	PKN3	2.21809	3.38701
	TMCC2	2.92257	2.59417
	RIMS3	2.58946	2.90971
	VANGL1	2.6469	2.83983
	CST7	2.13617	3.27985
	KLF7	2.18707	3.0731
SLC2A8	2.19213	3.00956	
WDFY4	2.63114	2.53328	
PRDM8	2.3308	2.79947	
CXCR5	2.25748	2.83076	
LCLAT1	2.1589	2.92567	
HLADOA	2.01472	2.80759	
MPP1	2.26483	2.76529	
GTBPB8	2.43574	2.30902	
SLC22A17	2.0281	2.71198	
PRF1	2.58589	2.00616	
PON2	2.31687	2.22824	
FAM123B	2.44789	2.02787	
CD8B	2.38115	2.02249	
CERS6	2.00365	2.33396	
PDCD1	2.01478	2.1763	
BAIAP2L1	2.0855	2.03146	

Patient	Gene	Fold change	
		K34	K36
K34 - K36	AEBP1	3.71979	10.963
	PLXNA4	9.5642	2.37487
	NCF1	6.10118	3.9584
	IGLL5	6.94325	2.90848
	RGMA	5.43265	3.16788
	HVCN1	2.53633	5.85421
	FCRLB	4.31059	3.62266
	PDE4DIP	5.29534	2.66923
	IL1B	4.10373	3.4645
	MYO15B	2.00457	5.24087
	ADAMTSL2	3.34361	3.59754
	PEX7	2.25847	4.63029
	XLOC_011803	4.51937	2.36137
	MAN1C1	3.9849	2.7009
	FBXL7	2.87207	3.55043
	CD300C	2.11602	4.03662
	EPB41L3	2.50991	3.47451
	PPA2	3.40726	2.0063
	EPHA1	2.61886	2.7169
	SNORD11619	2.09257	3.1484
	SHF	2.11522	3.05415
	KLHL29	2.73526	2.3386
LOC100653058	2.72512	2.22386	
XLOC_006883	2.3458	2.18737	
LOC440864	2.11202	2.40593	
LYRM4	2.20899	2.30067	
PPT2	2.0409	2.34814	
AOAH	2.05427	2.33472	
APBA2	2.3039	2.08208	
CSDA	2.23876	2.11792	
FBXO31	2.1853	2.15026	

Tableau 8 (supplementary data 6<sup>mll</sup>): List of genes down-regulated in CD4<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> TiL.

The microarray analysis identified 191 genes down-regulated in at least 2 of 3 kidney patient CD4 CD146<sup>+</sup> populations with a fold change  $\geq 2$ . Genes involved in inflammatory response according to IPA™ analyze are identified by a dot. ND: fold change  $\leq 2$ .

## References

1. Pages, F., et al., Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 2010. 29(8): p. 1093-102.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
3. Godin-Ethier, J., et al., Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(22): p. 6985-91.
4. Munn, D.H., et al., GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*, 2005. 22(5): p. 633-42.
5. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(4): p. 253-68.
6. Mantovani, A., P. Allavena, and A. Sica, Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer*, 2004. 40(11): p. 1660-7.
7. Banerjee, A., A. Vasanthakumar, and G. Grigoriadis, Modulating T regulatory cells in cancer: how close are we? *Immunol Cell Biol*, 2013. 91(5): p. 340-9.
8. Marincola, F.M., et al., Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*, 2000. 74: p. 181-273.
9. Vaupel, P., O. Thews, and M. Hoeckel, Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol*, 2001. 18(4): p. 243-59.
10. Carmeliet, P. and R.K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011. 473(7347): p. 298-307.
11. Jiang, T., et al., CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood*, 2012. 120(11): p. 2330-9.
12. Wang, Z. and X. Yan, CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett*, 2013. 330(2): p. 150-62.
13. Elshal, M.F., et al., CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood*, 2005. 106(8): p. 2923-4.
14. Elshal, M.F., et al., A unique population of effector memory lymphocytes identified by CD146 having a distinct immunophenotypic and genomic profile. *BMC Immunol*, 2007. 8: p. 29.
15. Larochelle, C., et al., Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain*, 2012. 135(Pt 10): p. 2906-24.
16. Guezguez, B., et al., Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *J Immunol*, 2007. 179(10): p. 6673-85.
17. Brucklacher-Waldert, V., et al., Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*, 2009. 132(Pt 12): p. 3329-41.
18. Bardin, N., et al., CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(5): p. 746-53.

19. Staquicini, F.I., et al., A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. *Cancer Res*, 2008. 68(20): p. 8419-28.
20. Flanagan, K., et al., Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PLoS One*, 2012. 7(7): p. e40443.
21. Grange, C., et al., Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation. *J Immunol Methods*, 2011. 372(1-2): p. 119-26.
22. d'Hennezel, E. and C.A. Piccirillo, Analysis of human FOXP3+ Treg cells phenotype and function. *Methods Mol Biol*, 2011. 707: p. 199-218.
23. Dagur, P.K., et al., CD146+ T lymphocytes are increased in both the peripheral circulation and in the synovial effusions of patients with various musculoskeletal diseases and display pro-inflammatory gene profiles. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010. 78(2): p. 88-95.
24. Dagur, P.K., et al., MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. *J Autoimmun*, 2011. 37(4): p. 319-27.
25. Kamiyama, T., et al., Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells. *J Dermatol*, 2012. 39(10): p. 838-42.
26. Antonioli, L., et al., CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*, 2013. 19(6): p. 355-67.
27. Mandapathil, M., et al., Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods*, 2009. 346(1-2): p. 55-63.
28. Mandapathil, M., et al., Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem*, 2010. 285(10): p. 7176-86.
29. Liu, W., et al., CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1701-11.
30. Nunez, S., et al., T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology*, 2013. 139(1): p. 61-71.
31. Koenen, H.J., et al., Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*, 2008. 112(6): p. 2340-52.
32. Alizadeh, D., E. Katsanis, and N. Larmonier, The multifaceted role of Th17 lymphocytes and their associated cytokines in cancer. *Clin Dev Immunol*, 2013. 2013: p. 957878.
33. Yoshioka, S., et al., Melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) is expressed on human luteinizing granulosa cells: enhancement of its expression by hCG, interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Mol Hum Reprod*, 2003. 9(6): p. 311-9.
34. Bardin, N., et al., Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood*, 2001. 98(13): p. 3677-84.
35. Simon, G.C., et al., Up-regulation of MUC18 in airway epithelial cells by IL-13: implications in bacterial adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. 44(5): p. 606-13.

36. Tsuchiya, S., et al., Involvement of transforming growth factor-beta in the expression of gicerin, a cell adhesion molecule, in the regeneration of hepatocytes. *Int J Mol Med*, 2007. 19(3): p. 381-6.
37. Rummel, M.M., C. Sers, and J.P. Johnson, Phorbol ester and cyclic AMP-mediated regulation of the melanoma-associated cell adhesion molecule MUC18/MCAM. *Cancer Res*, 1996. 56(9): p. 2218-23.
38. Levy, A.P., N.S. Levy, and M.A. Goldberg, Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem*, 1996. 271(5): p. 2746-53.
39. Scott, P.A., et al., Role of the hypoxia sensing system, acidity and reproductive hormones in the variability of vascular endothelial growth factor induction in human breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 1998. 75(5): p. 706-12.
40. Mesri, M., et al., Identification and characterization of angiogenesis targets through proteomic profiling of endothelial cells in human cancer tissues. *PLoS One*, 2013. 8(11): p. e78885.
41. Xie, S., et al., Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res*, 1997. 57(11): p. 2295-303.
42. Mills, L., et al., Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res*, 2002. 62(17): p. 5106-14.
43. Fuhrman, S.A., L.C. Lasky, and C. Limas, Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 1982. 6(7): p. 655-63.
44. Edge, S.B. and C.C. Compton, The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 2010. 17(6): p. 1471-4.
45. Lohr, J., B. Knoechel, and A.K. Abbas, Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev*, 2006. 212: p. 149-62.
46. Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe, The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*, 2010. 236: p. 219-42.
47. Strauss, L., C. Bergmann, and T.L. Whiteside, Functional and phenotypic characteristics of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer. *Int J Cancer*, 2007. 121(11): p. 2473-83.
48. Gavin, M.A., et al., Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*, 2007. 445(7129): p. 771-5.
49. Thornton, A.M., et al., Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol*, 2010. 184(7): p. 3433-41.
50. Sharma, M.D., et al., An inherently bifunctional subset of Foxp3<sup>+</sup> T helper cells is controlled by the transcription factor eos. *Immunity*, 2013. 38(5): p. 998-1012.



## **4<sup>ème</sup> Section : Discussion, perspectives et conclusions**

Les tumeurs humaines se développent dans un microenvironnement qui est variable d'un cancer à un autre. On se base sur l'identification de marqueurs protéiques et génétiques afin d'identifier le phénotype et la fonction des cellules qui les composent. Il est donc important de choisir des marqueurs fiables, reproductibles, cliniquement pertinents et qui possèdent une signification biologique afin d'obtenir des résultats les plus représentatifs de la réalité clinique. Malheureusement, la très grande hétérogénéité des tumeurs complexifie la caractérisation des cellules. Par exemple, la quantification ou l'identification de gènes peut être faussée par des cellules dites « contaminantes ». Ainsi, il est primordial d'identifier des marqueurs propres à une population de cellules qui pourront être par la suite utilisés en pathologie afin de déterminer le diagnostic et le pronostic des patients. Ces découvertes pourront représenter des cibles d'intérêt pour l'amélioration et la mise au point de thérapies innovantes contre le cancer.

Dans nos études, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'infiltrat immunitaire des tumeurs. L'implication de certaines cellules immunes dans la progression tumorale a été démontrée à la fois par leur type, leur densité et leurs fonctions, comme c'est le cas des lymphocytes T  $CD3^+ CD8^+ CD45RO^+$  [133]. Il est même aujourd'hui proposé d'utiliser cette infiltration immunitaire comme un marqueur pronostic de la maladie [144]. Cependant, le rôle de certaines cellules immunes fait encore l'objet de controverses [100], ce qui peut être expliqué entre autres, par le manque de marqueurs permettant de lier le phénotype à l'orientation fonctionnelle des cellules, mais aussi la qualité des échantillons étudiés. Ce sont sur ces problématiques que nous avons basé mes travaux de doctorat.

Étant donné que les caractérisations *ex vivo* des cellules immunes impliquent leur isolation des tissus et que cette étape peut influencer la biologie des cellules faussant ainsi leurs caractéristiques physiques et/ou fonctionnelles, nous avons, dans un premier temps, identifié une méthode optimale de désagrégation de tumeur ayant le minimum d'impact sur la biologie des TIIC. Nous avons ainsi comparé les effets d'une méthode de désagrégation mécanique utilisant la Médimachine<sup>TM</sup> à deux méthodes de digestion enzymatique sur la viabilité des cellules, la détection des marqueurs de surface et la capacité de prolifération des cellules.

Nos résultats nous ont permis d'apprécier les avantages de la désagrégation mécanique. Nous avons donc utilisé cette méthode afin de caractériser l'infiltration immunitaire de trois types de tumeurs fréquentes dans la population, soit les tumeurs de sein, de rein et de poumon.

Mon deuxième projet de doctorat a consisté à caractériser l'expression de la molécule d'adhérence CD146. Cette molécule, dont le rôle dans l'adhérence et la migration des cellules immunes venait d'être décrit dans les maladies auto-immunes, mais n'avait jamais été caractérisé dans les cellules immunitaires se trouvant dans un microenvironnement tumoral.

Dans cette section, je propose de résumer les accomplissements réalisés pour chacun des objectifs de mon doctorat, de réaliser une critique de nos résultats et de dégager des perspectives envisagées suite à nos observations.

#### **4.1 Détermination d'une méthode de désagrégation optimale des tissus tumoraux ayant un impact minimal sur la biologie des cellules immunitaires infiltrantes.**

##### **4.1.1 Retour sur les résultats de notre étude :**

La caractérisation par cytométrie en flux (CF) des TIIC implique la désagrégation du tissu tumoral en une suspension cellulaire. La littérature décrit, de nombreux protocoles qui mettent en oeuvre des méthodes de désagrégation mécanique ou des digestions enzymatiques dans ce but.

Dans notre étude, nous avons choisi d'évaluer les effets de trois méthodes de désagrégation sur des tumeurs de rein, de sein et de poumon. Nous avons ainsi comparé les effets d'une désagrégation mécanique utilisant la Médimachine<sup>TM</sup> et deux types de digestions enzymatiques (collagénase de type IA seule, ou un cocktail de collagénase de type IA, de type IV et DNase I type II) sur la biologie des cellules immunes infiltrantes.

Nous avons ainsi montré que la viabilité des cellules était affectée de manière égale par les trois méthodes (**Figure 9**). La détection des marqueurs de surface était moins affectée suite à une désagrégation des tissus par la Médimachine<sup>TM</sup> comparativement aux traitements

enzymatiques (**Figure 10, 11 et 13**). Enfin, nous avons montré que les digestions des tissus par des enzymes diminuaient le pourcentage de cellules T ayant proliféré ainsi que leur capacité de prolifération (**Figure 12, 14**).

#### **4.1.2 Justification et critique de nos résultats.**

##### *4.1.2.1 Choix du matériel et des méthodes.*

Étant donnée la grande variété de cellules immunitaires retrouvée dans l'infiltrat tumoral, la caractérisation par CF a été un choix judicieux. Cette méthode robuste permet d'identifier plus d'une dizaine de marqueurs à la fois sur une même cellule. Cette technique utilise des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes donnant ainsi de l'information sur les paramètres physiques des cellules comme leur taille, leur granulosité et leur phénotype. Elle permet aussi d'évaluer à la fois la présence et le niveau d'expression (intensité de fluorescence moyenne : MFI) d'un marqueur. Cette technique est utilisée de routine dans les laboratoires cliniques afin de déterminer les formules leucocytaires et en laboratoire de recherche pour caractériser des populations (expression de marqueurs extra ou intracellulaires, sécrétion de cytokines...), valider des marqueurs ou évaluer la prolifération cellulaire.

Cependant, dans le cas de la caractérisation de cellules infiltrant un tissu, cette méthode présente des inconvénients. Comparativement aux méthodes d'immunohistochimie ou d'immunofluorescence qui sont réalisées par des marquages sur des coupes de tissus fixés, le nombre d'analyses réalisables sur une même tumeur par CF est limité au nombre de cellules disponibles. Ces cellules ne pouvant être conservées plus de quelques jours et doivent être fixées. De plus, cette méthode n'informe pas sur la localisation des cellules dans l'architecture tumorale et nécessite que les tissus soient désagrégés en une suspension cellulaire. Il est toujours préférable de caractériser des cellules non traitées afin de conserver au mieux leurs propriétés d'origine. Dans le cas de l'étude des TIIC, la désagrégation du tissu est inévitable et telle qu'elle soit, elle peut provoquer des changements de la biologie des cellules, d'où l'intérêt de notre étude dans laquelle nous avons identifié une méthode de désagrégation qui modifie le moins la biologie des cellules à analyser.

Dû à la disponibilité du matériel biologique, nous n'avons pu comparer que trois méthodes de désagrégation de tissus de tumeurs de rein, de sein et de poumon. Afin de contrer l'hétérogénéité de l'infiltration immunitaire dans les tumeurs, celles-ci ont été coupées en morceaux de 2 mm<sup>2</sup>, mélangées puis séparées en trois parties de poids égaux.

Le choix de la Medimachine<sup>TM</sup> comme méthode de désagrégation mécanique a été fait, car ce dispositif était disponible dans notre laboratoire et a été précédemment utilisé dans l'étude des TIIC [262, 263]. Étant donnée la diversité des protocoles de digestion décrits dans la littérature, nous avons choisi deux protocoles de digestions utilisant de la collagénase de type I seule ou en combinaison à la collagénase de type IV et de la DNase I type II. Nous justifions le choix de ces enzymes par le fait que la matrice extracellulaire des tumeurs est essentiellement composée de collagène; le collagène de type I étant le plus communément distribué dans les tissus et le collagène de type IV étant l'un des principaux constituants des membranes basales. De plus, la combinaison collagénase de type IV et de la DNase I est la plus souvent retrouvée dans la littérature pour dissocier les tumeurs. Les résultats obtenus dans notre étude montrent que le cocktail enzymatique induit une forte perte de marqueurs et diminue plus fortement la capacité des cellules à proliférer que l'utilisation de la collagénase de type I seule. Malheureusement, nous ne pouvons pas affirmer si cette différence est due à la collagénase de type IV ou à la présence de DNase I, il aurait fallu évaluer l'effet de ces enzymes séparément.

#### *4.1.2.2 Limitations techniques rencontrées.*

Il n'a pas été possible d'évaluer l'effet réel des méthodes de désagrégation sur les TIIC tout simplement, parce qu'il était impossible d'obtenir des cellules immunes sans la désagrégation du tissu. Afin de trouver un comparable cellulaire, nous avons traité des PBMC de donneurs sains de la même façon que des tissus tumoraux. L'utilisation des PBMC a même permis d'évaluer l'impact des méthodes de désagrégation à différents temps (**Figure 10**).

Comme il a été mentionné précédemment, la quantité de matériel biologique disponible fut limitante dans cette étude. Nous avons choisi des tumeurs de taille suffisamment importante afin d'évaluer les trois types de traitements et finalement recueillir suffisamment de cellules pour réaliser des analyses significatives.

#### 4.1.2.3 Choix des paramètres évalués lors de notre étude.

L'analyse des sous-populations de cellules immunitaires par CF requiert l'utilisation de méthodes de désagrégation permettant d'obtenir un bon rendement en cellules viables, représentatives des populations cellulaires présentes dans la tumeur.

Le premier paramètre que nous avons évalué a été l'induction de la mortalité dans les échantillons. Plusieurs études ont montré qu'une désagrégation mécanique de tissus tumoraux permettait d'obtenir un plus faible rendement cellulaire induisant une plus grande mortalité des cellules [264, 265]. De plus, une étude publiée en 2000 par Novelli *et al.*, utilisant également la Médimachine™ pour la désagrégation de lymphomes cutanés a montré que cette technique induisait plus de mortalité des cellules immunes infiltrantes qu'une digestion enzymatique précédant la Médimachine™ [263]. Nous nous serions donc attendus à ce que la viabilité des cellules soit plus fortement affectée lors d'un traitement mécanique des tissus, suite au stress physique subi par les cellules. Finalement, même si la mortalité reste élevée (entre 20 % et 30 %), elle est comparable à la mortalité qui peut être induite par des méthodes de digestion enzymatique. Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par la différence de composition des tissus désagrégés et du programme de dissociation utilisé.

De plus, dans notre protocole nous avons isolé les cellules immunitaires de la suspension cellulaire par une centrifugation avec le *Lymphocyte separation medium* (Wisent bioproducts). Nous pensons qu'une partie des cellules mortes a pu être éliminée lors de cette étape.

Nous avons aussi observé que le rendement cellulaire obtenu après des digestions enzymatiques était, pour certains tissus, environ deux à trois fois plus élevé qu'avec la méthode mécanique.

Le deuxième paramètre que nous avons choisi d'évaluer est l'impact des méthodes de désagrégation sur les marqueurs de surface. La signature phénotypique et fonctionnelle d'une cellule peut être définie par les protéines retrouvées dans le compartiment extra ou intracellulaire, ou même dans le noyau. La technique de cytométrie en flux va permettre à la fois d'identifier la présence de ces protéines, mais aussi d'évaluer leur niveau d'expression.

Par exemple, les lymphocytes Treg sont, entre autres, caractérisés par l'expression constitutive de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25), mais seules les cellules T CD4<sup>+</sup> montrant une expression élevée de ce marqueur (CD25<sup>high</sup>) sont considérées comme immunosuppressives [106]. Ceci montre l'intérêt de travailler avec un matériel biologique dont l'intégrité est conservée afin que les caractérisations ne soient pas biaisées.

Le fait que les traitements enzymatiques affectent la détection des marqueurs de surface n'est pas un concept nouveau [266]. Il y a déjà 50 ans, Russell et ses collaborateurs étudiaient l'impact de différentes enzymes (la trypsine, la pronase, la collagénase, la papaïne et la chymotrypsine) sur des cellules immunes [267].

Ces effets peuvent être expliqués d'une part par le fait que les enzymes reconnaissent et coupent des séquences en acides aminés qui peuvent être présentes dans les marqueurs protéiques. D'autre part, lors d'une désagrégation tissulaire avec des enzymes, les cellules vont changer d'environnement pendant plusieurs minutes voire même pendant des heures. Les digestions enzymatiques sont souvent réalisées à 37°C, une température physiologique pour l'activité enzymatique, mais c'est aussi la température à laquelle la « machinerie » cellulaire fonctionne. Ce temps de digestion constitue alors un temps durant lequel la cellule va réagir au stress de son nouvel environnement et potentiellement changer son phénotype. Ainsi, plus le temps de digestion sera long et plus la cellule aura le temps de subir des modifications. L'avantage des méthodes mécaniques est que la désagrégation peut être réalisée sur glace. À cette température, la cellule arrête ou ralentit tous processus biologiques permettant de réaliser des observations plus proches de la réalité microenvironnementale des tissus d'origine.

Le dernier paramètre que nous avons évalué est la prolifération cellulaire. Même si ce paramètre n'a pas un lien direct avec la caractérisation des cellules immunes extraites d'un tissu tumoral par CF, il permet d'en évaluer l'aspect fonctionnel. Dans notre cas, nous avons évalué l'effet des trois méthodes de désagrégation sur la capacité de prolifération des lymphocytes T suite à une activation par un AC anti-CD3. Précédemment, une étude avait comparé les effets de méthodes de désagrégation sur la capacité des cellules tumorales à se diviser. Cette étude montre que les cellules obtenues à partir de tumeurs solides par des procédés de dissociation enzymatique forment plus facilement des clones [265].

Dans notre cas, étant donné le manque de littérature sur l'effet des digestions enzymatiques sur la biologie des cellules, nous ne pouvons que poser des hypothèses qui mériteraient d'être approfondies.

Malgré le fait que nous avons montré que les digestions enzymatiques n'affectent pas la détection du marqueur CD3 (**Figure 10-11**), nous pouvons supposer qu'elles pourraient altérer ou endommager la conformation du récepteur de surface empêchant ainsi la liaison avec l'anticorps anti-CD3 (OKT3) utilisé pour activer les cellules impliquées dans la prolifération des lymphocytes [268].

Les protéines induites par le stress de la préparation des cellules telles que les heat shock proteins (HSP) pourraient aussi être impliquées dans la diminution de prolifération observée.

#### **4.1.3 Perspectives et conclusion**

En résumé, les travaux que nous avons réalisés dans cette étude nous ont permis d'identifier la désagrégation mécanique par la Médimachine<sup>TM</sup> comme une méthode adaptée pour l'analyse des TIIC par CF. En effet, même si cette méthode génère un rendement de cellule plus faible que les méthodes enzymatiques, elle permet de préserver l'intégrité des marqueurs de surface et d'obtenir une désagrégation rapide à une basse température, maintenant ainsi intact les propriétés de la cellule en dehors du tissu d'origine.

Si la quantité de matériel biologique n'était pas limitante, il aurait été intéressant de comparer d'autres méthodes de désagrégation. Dernièrement, la compagnie Miltenyi<sup>TM</sup> a développé un système de dissociation spécifique aux tumeurs humaines combinant la désagrégation mécanique à la digestion enzymatique avec leur dissociateur le GentleMACS<sup>TM</sup>. On pourrait aussi comparer le rendement cellulaire obtenu par la Médimachine<sup>TM</sup> au GentleMACS<sup>TM</sup> en modifiant le protocole proposé et en enlevant les temps de digestion. Aussi, d'autres paramètres auraient pu être étudiés (analyse des gènes...), mais nous avons choisi les paramètres de comparaison en fonction des besoins techniques essentiels à la poursuite de nos projets soit la caractérisation phénotypique des TIIC par CF.



Pour conclure, l'étude des effets des méthodes de désagrégation sur le matériel biologique devrait être à la base de toutes les recherches faites sur les cellules extraites de tissus. Ceci permettrait l'identification de la méthode optimale permettant de conserver les propriétés biologiques étudiées pour ensuite réaliser la caractérisation phénotypique des cellules.

## **4.2 La molécule d'adhérence CD146 définit une population de lymphocytes T intratumorale avec des propriétés suppressives.**

### **4.2.1 Mise en contexte.**

Nous avons utilisé la méthode d'isolation leucocytaire optimale telle que précédemment déterminée, afin de caractériser les TIIC par CF dans des tumeurs de rein, de sein et de poumon. Nous avons porté une attention particulière à la CAM CD146 qui est exprimée par les cellules immunes du sang périphérique et plus particulièrement par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [233, 254]. Il a précédemment été montré que la proportion de CD4 exprimant CD146 augmente dans des conditions d'inflammation [202, 204, 255, 256] et que cette molécule joue un rôle dans la migration des cellules immunes au site d'inflammation [204, 256]. Cependant, aucune étude n'a précédemment décrit l'expression de CD146 dans l'infiltrat immunitaire tumoral.

Cette molécule ayant un rôle potentiel dans la migration et la répartition des cellules immunes au sein de la masse cancéreuse, il a donc été pertinent d'étudier l'expression de CD146 dans les TIIC.

### **4.2.2 Retour sur nos résultats.**

Nous avons évalué l'expression de la CAM CD146 dans les TIIC de tumeurs de sein, de rein et de poumon. Nous avons montré que cette protéine est exprimée par une faible proportion de cellules immunes dans les PBMC des patients et que cette proportion était semblable à celle des PBMC de donneurs sains (**Figure 15 A**). Certaines populations de leucocytes infiltrant le tissu tumoral ou le tissu adjacent à la tumeur, et particulièrement les

lymphocytes T ( $CD3^+ CD4^+$  et  $CD3^+ CD8^+$ ), expriment en plus grande proportion CD146. Dans les tumeurs, son expression est significativement plus élevée chez les lymphocytes T  $CD3^+ CD4^+$  (**Figure 15 B**) que dans le tissu normal adjacent.

Une caractérisation plus poussée des TIL  $CD4^+$  a permise de mettre en évidence que ces cellules présentaient des caractéristiques phénotypiques et génétiques liées aux cellules Treg (**Tableau 6 et Figure 19 et 20**).

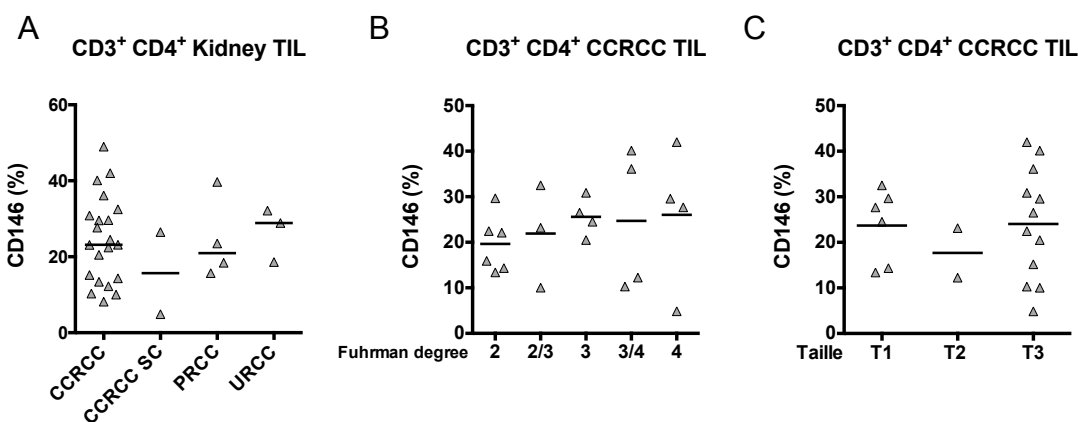
Nous avons cherché à identifier l'origine de cet enrichissement et nous avons montré qu'en contact avec des cellules tumorales l'expression de CD146 était augmentée dans les cellules immunes (**Figure 16 et 21**). Nous avons établi un lien entre l'expression de CD146 dans les lymphocytes T  $CD4^+$  et la présence de nécrose dans les tumeurs de rein (**Figure 17 A**). Ces observations cliniques furent validées *in vitro* par des expériences de co-cultures avec certaines lignées de cancer de rein dont la nécrose avait été induite par des chocs thermiques (**Figure 17-22**).

#### **4.2.3 Justification et critique du matériel biologique utilisé.**

Nous avons choisi de caractériser l'infiltration immune dans les cancers du rein, du sein et du poumon. Ces types de tumeur font parti des 5 cancers les plus diagnostiqués au Canada en 2013 (**Tableau 1**). Le critère de sélection des patients pour l'étude a été la taille des tumeurs. En effet, étant donné que nos évaluations phénotypiques ont été réalisées dans des sous-populations de cellules immunes, le nombre de cellules à analyser devait être suffisamment élevé afin d'obtenir des résultats significatifs. Nous avons alors sélectionné des patients avec des tumeurs dont la taille, dans le plus petit axe, était supérieure à deux centimètres. Nos échantillons présentent donc des variations de grade, de TNM et d'histologie (**Tableau 2, 3 et 4**) ce qui rend difficile les corrélations entre l'expression de CD146 et les caractéristiques cliniques basées sur nos résultats. Le diagnostic histologique de la tumeur étant déterminé par le pathologiste suite à l'analyse du prélèvement, il a été impossible de présélectionner les patients en fonction de l'histologie de leur tumeur.

Pour les tumeurs de rein, nous avons cherché à corréler l'expression de CD146 dans les TIL  $CD4^+$  aux paramètres histologiques disponibles dans les dossiers médicaux des patients.

Dans un premier temps, nous avons corrélé l'expression de CD146 au type de carcinome rénal (**Figure 25 A**). Cependant, aucune tendance ne s'est démarquée lors de cette analyse. Étant donné que les tumeurs de rein sont majoritairement des CCRCC, nous avons ensuite évalué s'il y avait un lien entre l'expression de CD146 dans les TIL CD4<sup>+</sup> et le grade de Furhman ou la taille de la tumeur (**Figure 25 B-C**). Encore ici, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence mais l'interprétation de ce résultat doit considérer le faible nombre d'échantillons.



**Figure 25 : L'expression de CD146 dans les CD4 n'est pas liée à l'un des paramètres clinico-pathologiques étudiés.**

**(A)** L'expression de CD146 dans les TIL CD4<sup>+</sup> de tumeurs de rein en fonction du type de carcinome rénal. CCRCC : carcinome rénal à cellules claires, CCRCC SC : carcinome rénal à cellules claires avec transformations sarcomatoïdes, PRCC : carcinome rénal papillaire, URCC : carcinome rénal inclassable.

**(B)** L'expression de CD146 dans les TIL CD4<sup>+</sup> de CCRCC en fonction du grade de Fuhrman.

**(C)** L'expression de CD146 dans les TIL CD4<sup>+</sup> de CCRCC en fonction de la taille de la tumeur déterminée par le TNM. T1 : tumeur <7 cm dans le plus grand axe, limitée au rein; T2 : tumeur >7 cm dans le plus grand axe, limitée au rein; T3 tumeur >10 cm dans le plus grand axe, avec envahissement de la veine rénale.

Une autre limitation liée au matériel biologique utilisé est que l'échantillon de tissu fourni par le pathologiste représente qu'une partie de la tumeur. L'infiltration immunitaire est connue pour être répartie de façon très hétérogène dans la tumeur [100]. De plus, elle peut même former des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) qui sont des structures dans la tumeur

possédant des propriétés communes aux ganglions lymphatiques dans lesquelles les APC vont présenter les antigènes tumoraux aux cellules T et B [269]. Plus la tumeur est volumineuse et moins les cellules contenues dans le prélèvement représentent la variabilité réelle de l'infiltration.

Afin de compléter notre étude, nous proposons donc, de caractériser l'expression de CD146 sur des coupes de tissus entiers en immunohistochimie ou en immunofluorescence. Même si ces méthodes vont limiter le nombre de marqueurs étudiés par lame, elles vont nous apporter des informations sur la répartition intra-tissulaire des cellules immunes exprimant CD146.

Les équipes de recherche de l'Institut du Cancer de Montréal dont notre laboratoire fait partie, hébergent des banques biologiques de tissus de nombreux types de cancers. Nous gérons une banque biologique de cancer du sein qui possède plus de 2000 échantillons et la banque de cancer de rein du Dr J-B Latouff contient plus de 270 échantillons. Il serait donc possible d'obtenir des coupes de tissus sur lames afin d'évaluer et localiser l'expression de CD146 dans l'infiltrat immunitaire et de réaliser des études statistiques afin de corrélérer ces données aux paramètres clinico-pathologiques des patients.

#### **4.2.4 Interprétation de nos résultats.**

##### *4.2.4.1 Phénotype distinct des cellules immunes exprimant CD146 dans les tumeurs.*

Chez les patients atteints d'un cancer, l'expression de CD146 dans les PBMC est faible et comparable à l'expression de CD146 chez les donneurs normaux (**Figure 15 A**). Les patients atteints de maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques (SEP), montrent une proportion de leurs PBMC exprimant CD146 plus élevée [204, 255]. Dans leurs travaux réalisés chez des patients souffrant de SEP, Laroche et ses collaborateurs ont observé que cette proportion varie en fonction de la gravité de la maladie; l'expression de CD146 étant plus élevée dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les patients en rechute aigüe que chez les patients sous traitement. Ceci démontre une association entre l'expression de CD146 dans les lymphocytes et la phase inflammatoire de la maladie [204]. Ces observations prouvent

l'importance du microenvironnement tissulaire dans la modulation de l'expression de CD146 dans les cellules immunes.

Par ailleurs, les profils phénotypiques et génétiques des cellules que nous avons caractérisés dans les TIIC diffèrent des observations faites dans les cellules immunes de patients souffrant de maladies auto-immunes. Même si nos résultats confirment que l'expression de CD146 est majoritairement retrouvée dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, cette expression est également retrouvée dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et dans les phagocytes (monocytes/macrophages/DC) (**Figure 15 et 18**). Une très récente étude rapporte la caractérisation des lymphocytes T CD8 exprimant CD146 chez les donneurs sains et chez des patients souffrant de maladies autoimmunes [270]. Les TIIC exprimant de faibles niveaux de CD146 (CD146<sup>Low</sup>) sont majoritairement des CD3<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> (**Figure 18 B et C**), un type de cellules immunitaires que nous n'avons pas davantage étudié, mais qu'il serait intéressant de caractériser ultérieurement afin de déterminer les proportions de cellules immunosuppressives (macrophages M2, MDSC...) qui les composent. En effet, la proportion des cellules CD3<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> exprimant CD146 dans les tissus adjacents aux tumeurs de poumon représente plus de 50 % de cette population alors qu'elle est presque nulle dans les PBMC des mêmes donneurs.

Lorsqu'on précise nos caractérisations aux sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant CD146, nos observations dans les tumeurs diffèrent de celles réalisées dans les maladies auto-immunes. Il est maintenant bien décrit que lors de la phase de différenciation des lymphocytes T CD4, l'équilibre et l'interaction des cytokines présentent dans le microenvironnement vont déterminer leur polarisation en Th ou en Treg [271, 272]. Ce microenvironnement étant différent dans les maladies auto-immunes comparativement aux tumeurs, il est donc normal de trouver des variations du phénotype des cellules exprimant CD146 et aussi des niveaux d'expression de CD146 dans les tumeurs d'un même type de tissu.

Dans les maladies auto-immunes, l'expression de CD146 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est liée au profil phénotypique et génétique des Th17 [204, 255, 256]. Dans notre étude, nous avons confirmé par *microarray* l'expression de certains gènes liés aux cellules Th17 tels que IL-7 ou le RORC dans les TIL CD4<sup>+</sup> exprimant CD146 (**Tableau 7**). Cependant, notre

caractérisation phénotypique de ces TIL exprimant ou non CD146, suite à une activation avec PMA/Ionomycine, montre qu'une très faible portion de ces cellules sécrète de IL-17A (**Figure 19**). Il serait intéressant de confirmer ces observations en ajoutant d'autres marqueurs caractéristiques des Th17 tels que CCR6, CCR4, IL-23R et CD161 [273, 274]. Cependant, nous pensons que le faible nombre de Th17 observé pourrait s'expliquer par les raisons suivantes :

- Les tumeurs sont fortement infiltrées par des cellules Treg qu'on retrouve aussi dans le sang de patients atteints du cancer [106, 275]. Ces cellules sont essentiellement des iTreg induites par la présence de VEGF, IL-10 et TGF- $\beta$  présents dans le microenvironnement tumoral [93, 117, 276]. Compte tenu de l'importance du microenvironnement tumoral sur le conditionnement des lymphocytes T CD4 en Treg, il est donc logique de trouver des cellules exprimant la CAM CD146 parmi les cellules qui ont un profil de cellules Treg dans les tumeurs.

- Même si les cellules tumorales, les fibroblastes et les APC, présents dans le microenvironnement tumoral, sécrètent des cytokines telles que le TGF- $\beta$ , IL-23, IL-6, IL-1 $\beta$  et IL-21, formant ainsi un milieu favorable à l'expansion et la régulation des Th17 [277, 278], leur rôle dans l'immunité antitumorale est encore mal défini et reste controversé [279]. En effet, chez l'humain, les Th17 inhibent et participent à la progression tumorale. [280]. Ceci peut être expliqué par plasticité des Th [271]. En effet, bien que les cellules Th semblent représenter des populations de CD4 phénotypiquement et fonctionnellement distinctes, ces cellules vont être conditionnées par leur milieu et peuvent en conséquence changer de phénotype et de fonction [281]. À ce propos, les Th17 sont connues pour avoir une forte capacité de plasticité [282, 283]. Dans des conditions tumorales, ces cellules ont été montrées comme pouvant se différencier en cellules ayant des propriétés apparentées aux Th1 [284].

- Les cellules Th17 et les Treg ont des rôles opposés dans le développement de maladies auto-immunes et inflammatoires. Alors que les cellules Th17 vont promouvoir l'auto-immunité, les cellules Treg vont maintenir la tolérance du soi en contrôlant l'expansion et l'activation des cellules T effectrices CD4<sup>+</sup> autoréactives. Ces observations suggèrent que CD146 peut être exprimé par des cellules ayant un rôle clef dans la pathologie observée soit les Th17 dans des situations d'auto-immunité et les Treg dans les cancers.

Les tumeurs que nous étudions ont une taille supérieure à 2 cm dans le plus petit axe, ce qui signifie qu'elles ont mis en place des mécanismes immunosuppresseurs dont le recrutement et l'induction de Treg. Il est intéressant de constater qu'une plus grande proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant CD146 possède un profil phénotypique associé aux cellules Treg comparativement à ceux qui n'expriment pas CD146 (**Figure 19 et 20**). Les cellules CD4<sup>+</sup> CD146<sup>+</sup> montrent des profils de gènes liés aux cellules immunosuppressives (**Tableau 6**). Il serait intéressant de compléter notre étude génétique et phénotypique par l'étude du sécrétome des CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> CD146<sup>+</sup> afin d'identifier leur fonction et leur rôle dans le microenvironnement tumoral.

#### 4.2.4.2 Les facteurs induisant l'expression de CD146.

Comme mentionné auparavant, des études ont montré qu'il est aussi possible d'induire l'expression de CD146 dans les cellules par des signaux environnementaux tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-1a [223, 224], l'IL-13 [225]), des facteurs de croissance (l'endothéline-1 [226], le TFG- $\beta$  [227], le NGF [228]), un taux élevé de glucose [229], une concentration élevée de Ca<sup>2+</sup> [230] et une augmentation de AMPc [231]. Certains de ces facteurs sont retrouvés dans le microenvironnement tumoral. Cet environnement est très complexe et formé de nombreuses cellules qui interagissent les unes avec les autres *via* la sécrétion de différents facteurs comme des cytokines ou des facteurs de croissance. Quoique techniquement complexe, il serait intéressant de séparer chaque constituant d'une tumeur et de les co-cultiver avec des PBMC autologues afin d'identifier les cellules responsables de l'induction de l'expression de CD146 et de caractériser les mécanismes mis en jeu dans ce processus.

Nos observations ont permis de soulever des pistes qui devront être approfondies, mais qui ont permis d'identifier des facteurs responsables de l'induction de CD146 dans les cellules immunes :

Lors d'essais *in vitro*, nous avons confirmé que l'activation des lymphocytes par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 induit l'expression de CD146 (**Figure 16**) [232]. Nous avons aussi observé que cette induction pouvait être réalisée en présence de cellules de lignées

tumorales dans les lymphocytes T CD4 ou CD8 (**Figures 16 et 21**). Ce qui suggère que CD146 se comporte comme un marqueur d'activation.

Intéressamment, la co-culture *in vitro* de PBMC non-activées avec des cellules cancéreuses, résulte en l'induction de CD146 dans les lymphocytes (**Figures 21**), particulièrement lorsque les cellules tumorales expriment CD146, ce qui suggère un possible rôle des interactions homotypiques dans l'augmentation de l'expression de CD146. Afin de vérifier ce point, il serait intéressant de réaliser des co-cultures de PBMC avec des lignées de cellules tumorales dont l'expression de CD146 serait bloquée par un anticorps [204, 254] ou par l'utilisation ARN interférant.

Après avoir mis en évidence l'implication des cellules tumorales dans l'expression de CD146, on s'est demandé si cette induction pouvait varier en fonction de l'état physiologique des cellules tumorales. En effet, les tumeurs solides sont caractérisées par leur vascularisation très hétérogène. Elles contiennent donc de larges régions souffrant d'un manque d'oxygène (hypoxie) dans lesquelles les cellules sont en souffrance. Ces zones ont été largement mises en évidence dans la plupart des grosses tumeurs (> 10 mm) [285] et une étude a même montré que les petites tumeurs (< 1 mm) sont également pauvrement vascularisées et présentent de l'hypoxie [286]. L'environnement pauvre en nutriments carbonés et en oxygène exerce ainsi une pression sur les cellules tumorales aboutissant à leur mort et à la formation de zones de nécrose dans les tumeurs.

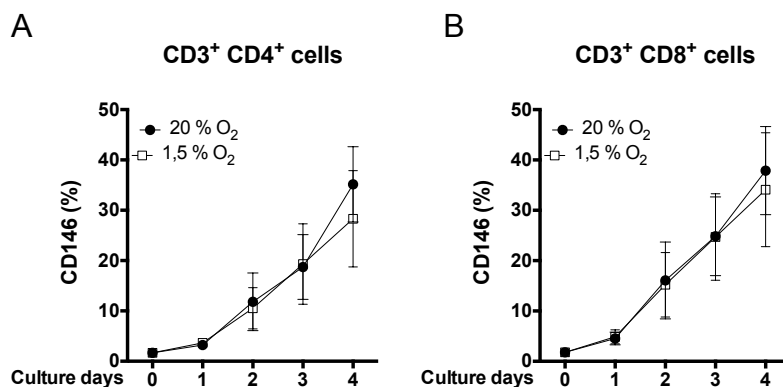
Il a été très intéressant de mettre en évidence un lien entre l'expression de CD146 dans les TIL CD4<sup>+</sup> déterminée par CF et la présence de nécrose dans les tumeurs de CCRCC décrite dans les rapports de pathologie (**Figure 17 A**). Des études plus poussées sur des coupes de tissus pourraient être réalisées à l'avenir afin de localiser les cellules exprimant CD146 et les zones de nécroses dans les tumeurs afin de vérifier le lien entre ces deux paramètres.

Nous avons évalué *in vitro* l'implication de l'hypoxie et des dommages qu'elle peut causer sur les cellules (nécrose) dans l'induction de l'expression de CD146 dans les cellules immunes.

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de comparer l'expression de CD146 dans des lymphocytes cultivés en normoxie (20 % O<sub>2</sub> soit environ 160 mm de mercure



(Hg)) à des lymphocytes cultivés en hypoxie (environ 1,5 % O<sub>2</sub> soit 10 mm Hg) (**Figure 26**). Nous n'avons observé aucune différence d'expression de CD146 dans les lymphocytes cultivés dans ces deux conditions. Afin de valider le statut hypoxique dans lequel nos cellules ont été cultivées, nous souhaitons mesurer l'expression du facteur induit par l'hypoxie (HIF) dans les lymphocytes. En moyenne, la pression en O<sub>2</sub> dans la fraction hypoxique globale des tumeurs du sein est de 10 mm de Hg. Il a été montré que dans d'autres types de tumeurs, la pression en O<sub>2</sub> pouvait descendre à moins de 2 mm de Hg, ce qui correspond à un niveau d'oxygène atmosphérique inférieur à 0,2 % [287]. Il serait donc intéressant de confirmer nos résultats avec des cultures à des niveaux plus faibles d'O<sub>2</sub>.



**Figure 26 : Impact de la déplétion en O<sub>2</sub> sur l'expression de CD146 dans les lymphocytes.**

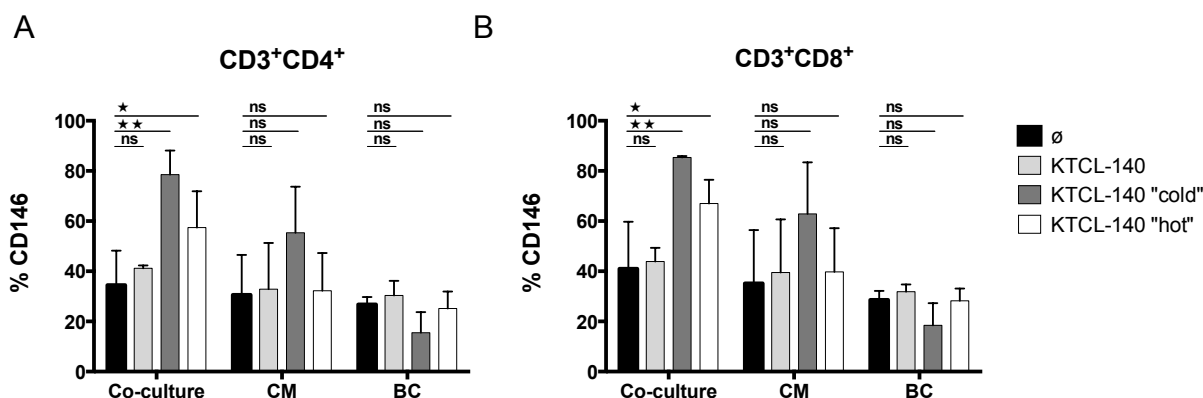
Des PBMC de donneurs normaux (n=3) ont été cultivées dans des conditions d'activation (anti-CD3, anti-CD28 et IL-2) pendant 4 jours en normoxie (20 % O<sub>2</sub> distribué par un incubateur de base) ou en hypoxie (environ 1,5 % O<sub>2</sub>). L'expression de CD146 a été évaluée par CF dans les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (**A**) et dans les CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (**B**).

Ensuite, nous avons testé *in vitro* l'impact des cellules tumorales en nécrose. Pour ce faire, nous avons co-cultivés des PBMC avec des cellules de lignée de cancer du rein les KTCL-140 et les A-498 dont la mort avait été induite par différents chocs thermiques. Le statut de mort des cellules étant confirmé par un marquage Annexine V/7-AAD (**Figure 22**). Pour les KTCL-140, lors de la co-culture de PBMC avec des cellules tumorales dont la mort avait été provoquée par des chocs thermiques dits « à froid » (5 cycles de 5 minutes cycles à -

80°C puis +37°C) on observe une plus forte expression de CD146 dans les lymphocytes T que lors de la coculture avec des cellules tumorales traitées par chocs thermiques dits « à chaud » (5 cycles de 5 minutes cycles à +60°C puis +4°C) ou que la co-culture de cellules tumorales non traitées (**Figure 17 B à G**). Nous avons remarqué que ces deux types de traitement induisent différentes nécroses, ainsi un traitement des cellules par un choc thermique « à froid » induit une destruction complète des cellules alors qu'un traitement à « à chaud » induit la mort des cellules, mais permet de conserver leur intégrité (**Figure 22**), ceci permet de supposer que les facteurs responsables de l'induction de CD146 se trouvent dans la cellule tumorale. Les résultats obtenus avec les KTCL-140 n'ont pas été répétés avec les A-498 (**Figure 23**) dont la mort a été induite de la même façon. Nous proposons de réaliser ces expériences avec d'autres lignées de cancer du rein exprimant CD146 et de réaliser une étude protéomique sur le contenu de KTCL-140 traitées des deux façons afin d'identifier le ou les facteurs induisant CD146 dans les cellules.

Nous sommes conscient que ces conditions de mort cellulaire ne sont pas physiologiques et ne seront pas retrouvées dans les tumeurs toutefois, la nécrose par choc thermique se rapproche probablement de la nécrose intra-tumorale (production de *damage-associated molecular patterns*). Il serait intéressant de voir si nos résultats peuvent être répétés avec des cellules tumorales dont la mort pourrait être induite par hypoxie prolongée à des niveaux d'O<sub>2</sub> se rapprochant de ce que l'on retrouve des les tumeurs réellement hypoxique comme le cancer du rein par exemple.

Nos résultats ont permis de montrer que l'induction de CD146 par les cellules tumorales et les cellules nécrotiques nécessite un contact direct avec les PBMC (**Figure 17 et 27**). En effet lorsque les PBMC sont séparées des cellules tumorales par une membrane poreuse ou qu'elles sont cultivées en présence de milieu conditionné par les cellules tumorales, les PBMC conservent une expression en CD146 constante, alors que les cellules cultivées en contact direct avec les cellules tumorales montrent une augmentation de leur expression. Ceci nous laisse penser que les cellules tumorales vont participer à l'induction sélective de l'expression de CD146 dans les TIIC.



**Figure 27 : L'expression de CD146 induite dans les cellules immunes lors du contact avec les cellules tumorales.**

1X10<sup>6</sup> PBMC de donneurs sains (n=3) ont été cultivées dans des conditions d'activation (anti-CD3, anti-CD28, IL-2 voir section Matériel et Méthodes du Manuscrit II) dans une plaque 24 puits pendant 3 jours (∅) avec 5X10<sup>5</sup> KTCL-140 (KTCL) ou des KTCL-140 dont la nécrose a été induite par un choc thermique dit « à froid » : KTCL « cold » (5 cycles de 5 min de -80°C à +37°C) ou à chaud : KTCL « hot » (5 cycles de 5 min de +60°C à +4°C); ou bien avec des milieux conditionnés (CM) obtenus par centrifugation après traitement de ces cellules. Dans une troisième condition, les PBMC et les cellules tumorales ont été physiquement séparées lors de leur culture en chambre de Boyden avec une membrane composée de pore de 3 µm. Les PBMC ont été cultivées dans l'insert et les cellules tumorales dans la plaque.

L'expression de CD146 a été évaluée en cytométrie en flux dans les lymphocytes CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A) et les CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (B). Chaque expérience a été réalisée en duplicata. Ici représenté la moyenne ± SEM.

Enfin, nos études *in vitro* ont montré que le niveau d'expression de CD146 induit par contact avec des cellules tumorales ou par des cellules tumorales nécrotiques était le même dans les lymphocytes T CD4 et dans les CD8 alors que *in vivo*, nos résultats ont montré que l'expression de CD146 n'est pas présente dans toutes les populations de TIIC (**Figure 15**). Nous supposons que cette observation est causée par une activation spécifique facilitée *in vitro* l'activation de récepteurs présents à la surface de certaines populations de cellules immunes.

#### 4.2.5 Conclusions et hypothèses.

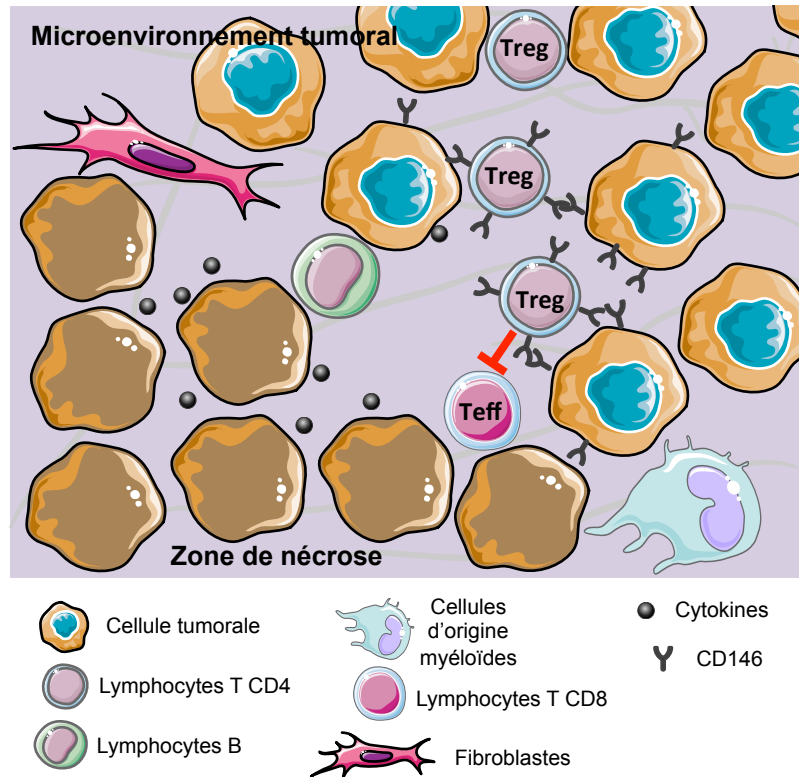
CD146 est une molécule d'adhérence, qui d'après nos études est enrichie dans certaines populations de cellules immunes infiltrant les tumeurs et plus particulièrement chez

les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Parmi ces cellules, nous avons mis en évidence qu'une forte proportion possédait un profil phénotypique et génétique de cellules immunorégulatrices comparativement aux lymphocytes T CD4 n'exprimant pas CD146. Cette signature est propre aux cellules immunitaires se trouvant dans le microenvironnement tumoral. En essayant d'identifier l'origine de cette expression, nous avons mis en évidence l'implication des cellules tumorales et plus particulièrement les cellules tumorales nécrotiques dans l'induction de cette CAM.

Il reste encore de nombreuses questions afin d'expliquer l'origine de l'expression et le rôle de CD146 dans les TIIC. Basés sur nos observations et sur la littérature récente, nous proposons les pistes de réflexion suivantes :

#### *4.2.5.1 CD146 augmenterait la capacité de migration des cellules dans la tumeur.*

Nos résultats montrent que le contact direct des lymphocytes avec des cellules tumorales entraîne l'induction de l'expression de CD146. Ceci laisse supposer qu'une fois entrées dans la tumeur, les cellules tumorales peuvent induire l'expression de CD146 dans certaines cellules immunes. L'acquisition de cette molécule d'adhérence pourrait permettre d'augmenter la mobilité des cellules immunes dans la tumeur afin qu'elles atteignent leur cible et qu'elles exercent leur fonction. Nous pensons que cette induction est faite sélectivement sur les cellules immunosuppressives, les Treg, représentant ainsi un mécanisme d'échappement de la tumeur (**Figure 28**).



**Figure 28 : Modèle 1 ; Induction de CD146 dans les Treg.**

Une fois en contact avec des cellules tumorales l'expression de CD146 va être induite spécifiquement dans certaines sous populations de cellules immunes et particulièrement dans les Treg. Celles-ci vont alors créer des liaisons homotypiques avec les cellules tumorales qui expriment CD146 permettant ainsi aux Treg de se déplacer dans la tumeur et d'atteindre leur cible afin que les cellules inhibent l'action des cellules effectrices.

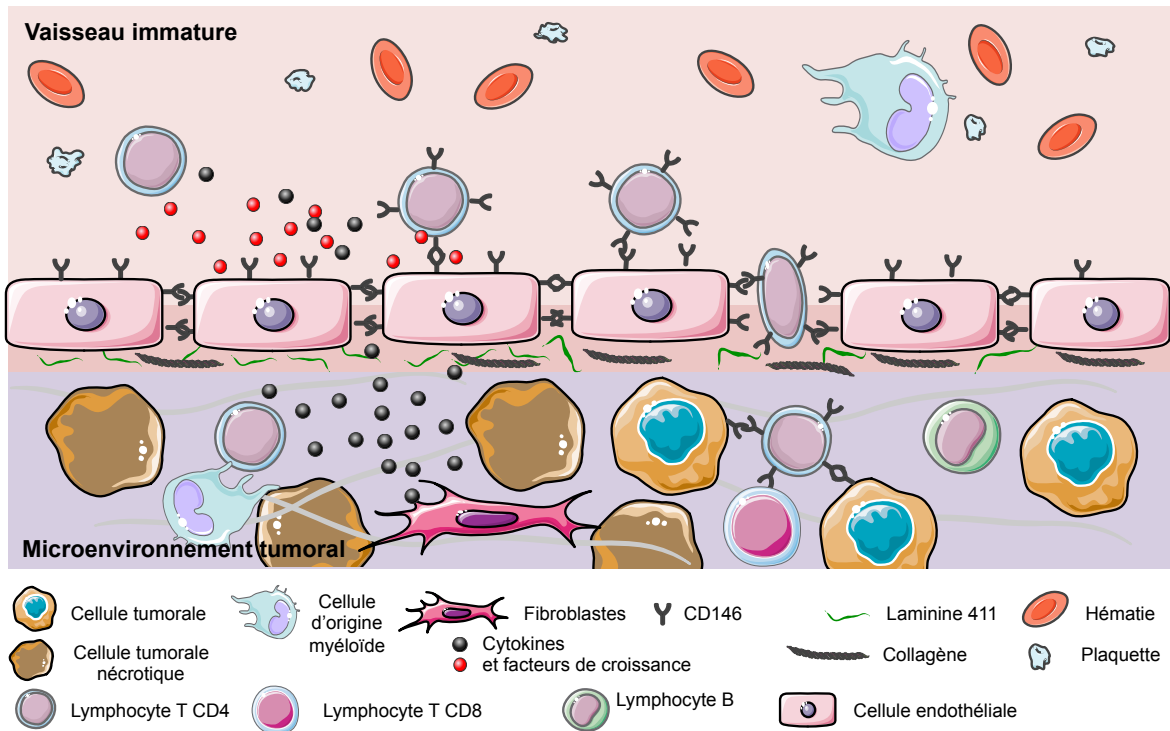
#### 4.2.5.2 *CD146 participe au recrutement de cellules immunitaires à la tumeur.*

Les études réalisées sur la fonction de CD146 dans les cellules immunes ont montré son implication dans les étapes de roulement, d'adhérence [216] et de transmigration des cellules immunes à travers l'endothélium [204, 256] *via* des liaisons homotypiques [216, 218] et aussi par la formation de liaisons hétérotypiques avec la laminine 411 exprimée sélectivement dans la membrane basale de l'endothélium vasculaire [256]. Ceci nous laisse penser que cette CAM pourrait jouer un rôle important dans le processus de recrutement des cellules immunes à la tumeur.

Dans notre étude, nous nous sommes seulement intéressés à l'effet des cellules tumorales sur l'expression de CD146 dans les cellules immunes, mais nous pensons que d'autres cellules sont impliquées directement et indirectement à cette induction. Nous pensons notamment aux cellules endothéliales qui vont être influencées par la tumeur afin de participer activement au recrutement des cellules immunes.

Il est connu que les cellules tumorales vont sécréter de nombreux facteurs afin de favoriser la formation d'un nouveau réseau sanguin (angiogenèse) dont le VEGF et particulièrement en condition d'hypoxie [288-290]. CD146 est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales [224, 291] et a été impliqué dans le phénomène de néo-vascularisation [251, 252, 292]. En effet, CD146 serait impliqué dans la signalisation du VEGF en interagissant directement avec le VEGFR-2 [252]. Cette interaction permettrait d'induire la voie de signalisation AKT/p38 MAPKs/ NF- $\kappa$ B dans les cellules endothéliales afin de promouvoir la néo-vascularisation.

On peut alors supposer que les cellules immunitaires présentes dans ces nouveaux vaisseaux, pourraient former des liaisons homotypiques avec les cellules endothéliales, traverseraient l'endothélium pour atteindre la tumeur. On peut aussi supposer que l'environnement présent dans ces vaisseaux immatures, influencé par la tumeur (VEGF, TNF...), pourrait conditionner à la fois l'expression de CD146 et la polarisation cellules immunes (**Figure 29**).



**Figure 29 : Modèle 2 ; CD146 participe au recrutement des cellules immunes à la tumeur.**

Les cellules tumorales et plus particulièrement les cellules nécrotiques vont sécréter des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF afin de provoquer la formation du réseau néo-vasculaire. Le milieu présent dans ces vaisseaux immatures va conditionner le phénotype des cellules immunes et induire sélectivement l'expression de CD146. Ces cellules pourront se lier de façon homotypique aux cellules endothéliales provoquant leur roulement et leur adhérence. Lors de la transmigration CD146 se lie à la laminine-411 afin de traverser la membrane basale. Une fois dans la tumeur, les cellules immunes pourront alors se lier avec les cellules tumorales afin de progresser et atteindre leur site d'action.

## 4.2.6 Perspectives.

### 4.2.6.1 Confirmation de nos hypothèses.

Afin de valider l'implication de CD146 dans le processus d'infiltration des leucocytes à la tumeur, nous proposons les expériences suivantes :

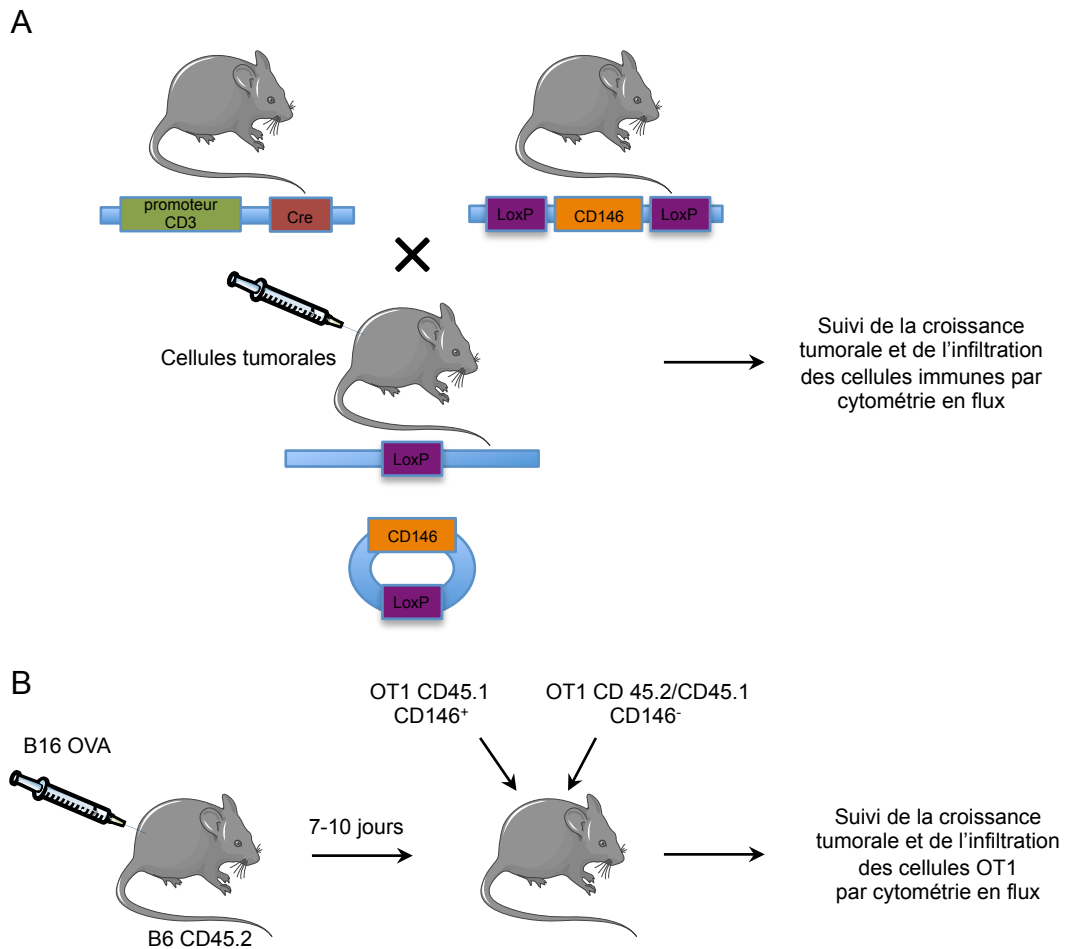
*In vitro*, il serait intéressant de comparer la capacité d'adhérence des cellules immunes aux cellules endothéliales (HUVEC) en fonction de leur expression de CD146 par système d'adhésion en flux dynamique. Et aussi d'adapter le modèle expérimental de transmigration en chambre de Boyden modifiée par le groupe de Dr Prat [204] afin de tester la capacité de migration des cellules immunes à travers des cellules endothéliales en présence de cellules tumorales nécrotiques.

*In vivo* l'utilisation d'un modèle murin déficient en CD146 n'est pas possible car cette CAM est impliquée dans l'implantation utérine de l'embryon [237]. Cependant, d'autres modèles peuvent être développés :

Il serait possible de générer des souris déficientes en CD146 spécifiquement dans les lymphocytes T par le système de recombinaison Cre/loxP [252]. L'implantation de cellules tumorales serait réalisée par une injection sous-cutanée. Le suivi du développement de la tumeur (taille) et de l'infiltration intratumorale serait comparé à des souris non déficientes (**Figure 30 A**). On pourra aussi réaliser ces expériences avec différentes lignées tumorales.

Nous proposons également d'induire génétiquement l'expression de CD146 [216] dans des cellules OT1 possédant le marqueur allotypique CD45.1 (OT1 CD146<sup>+</sup>) versus des cellules OT1 dont l'expression de CD146 a été inhibée par l'utilisation d'un shRNA possédant les marqueurs allotypiques CD45.2/ CD45.1 (OT1 CD146<sup>-</sup>). Ces deux types cellulaires seront co-injectés par transfert adoptif à des souris B6 CD45.2 développant une tumeur B16 OVA. On pourra alors comparer l'infiltration intra-tumorale des lymphocytes en fonction de leur expression en CD146 (**Figure 30 B**). Si aucune infiltration des cellules transférées n'est observée, l'utilisation de souris déficientes en cellules T (CD3<sup>-/-</sup>) pourrait être envisagée.





**Figure 30 : Modèles murins proposés pour notre étude :**

Afin d'évaluer l'implication de CD146 dans l'infiltration des lymphocytes T à la tumeur nous proposons les modèles suivants :

**(A)** Génération de souris déficientes en CD146 spécifiquement dans les lymphocytes T par le système de recombinaison Cre/loxP. Injection de cellules tumorales est suivie de la croissance de la tumeur et de l'infiltration des lymphocytes par cytométrie en flux.

**(B)** Des cellules tumorales B16 OVA sont injectées dans des souris B6 CD45.2. Après 7-10 jours, une fois que la tumeur est formée, des cellules OT1 CD45.1 dont l'expression de CD146 a été génétiquement induite sont co-injectées avec des cellules OT1 CD45.2/CD45.1 dont l'expression de CD146 a été inhibée par un shRNA. L'infiltration des cellules OT1 est alors évaluée par cytométrie en flux.

#### 4.2.6.2 Application dans le traitement du cancer.

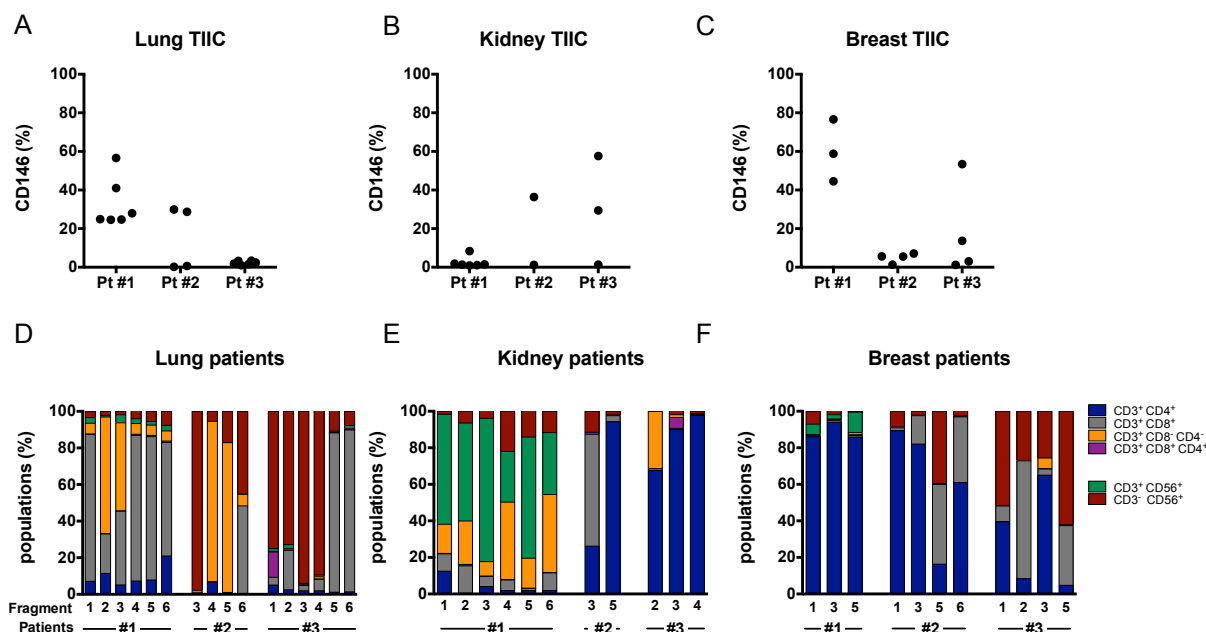
Si CD146 joue le rôle que nous pensons dans la migration des cellules immunes à la tumeur, cette molécule pourrait avoir un rôle clef afin d'augmenter la capacité des TIL spécifiques à atteindre leur cible lors d'immunothérapies.

Même si la littérature suggère que les améliorations apportées à l'immunothérapie du cancer à médiation cellulaire telle que l'ACT, doivent s'attarder à augmenter la variété et la force de la réponse immunitaire anti-tumorale, et aussi augmenter la persistance des cellules suite au traitement, nous pensons qu'il faudrait également s'attarder sur l'augmentation de la capacité des cellules spécifiques à atteindre leur cible. Par ailleurs, on sait que le nombre et la localisation des TIL à l'intérieur de la tumeur ont précédemment été corrélés avec les résultats cliniques pour les différentes tumeurs malignes [131, 293], ce qui confirme l'utilité de favoriser le potentiel d'infiltration des TIL via CD146.

Il serait donc intéressant d'étudier la capacité d'infiltration des TIL en fonction de l'expression de CD146 dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Dans des modèles murins, déterminer si l'expression de CD146 peut être corrélée à une diminution de la taille de la tumeur suite à l'injection de CD8 générées par expansion *in vitro*.

Nous avons réalisé quelques expériences préliminaires afin de caractériser l'expression de CD146 dans les cultures de TIL à partir de fragments de tumeurs cultivés en haute-dose IL-2 (**Figure 31**). Nous avons montré que ces cultures présentaient des niveaux d'expression très variables de CD146 même pour des cultures à partir de fragments issus de la même tumeur (**Figure 31 A-B-C**) ce qui pourrait expliquer le faible taux de réponse des patients au transfert adoptif de cellules, qui montrent pourtant leur efficacité *in vitro*.

Nous avons aussi observé que les cellules exprimant CD146 n'était pas majoritairement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (**Figure 31 D, E, F**) contrairement à ce qu'on avait observé dans les TIIC avant culture (**Figure 14**). Ceci signifie qu'après culture en hautes-doses d'IL-2, nous serions capables de générer des CD8 cytotoxiques exprimant CD146. Des expériences consistant à induire génétiquement l'expression de CD146 dans ces TIL pourrait être réalisées afin de comparer l'efficacité sur la progression tumorale.



**Figure 31 : Caractérisation de l'expression de CD146 dans les cultures de TIIC en hautes-doses IL-2 à partir de fragments tumoraux.**

Six fragments de 3mm<sup>2</sup> ont été découpés au scalpel à différents endroits de tumeurs de rein, de rein et de poumon (n=3 patients pour chaque tumeur). Les fragments ont été cultivés dans des plaques de 24 puits à raison de 1 fragment/puit avec 2 mL de milieu (50 % RPMI, 50 % AimV®, 5 % sérum humain AB décomplémenté, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL pénicilline/streptomycine et 10 µg/mL gentamicine) complémenté de 30 000 U/ml d'IL-2 pendant 20 à 30 jours. La moitié du milieu a été changé par du milieu frais complémenté en IL-2 au 5<sup>ème</sup> jour de culture puis tous les 2-3 jours pendant 30 jours. Lorsque les cultures arrivaient à confluence dans les puits, les cellules ont été divisées dans deux puits.

(A, B, C) L'expression de CD146 a été déterminée par CF dans les cultures de TIIC obtenues à partir chaque fragment.

(D, E, F) Représente la caractérisation des sous-populations composant la fraction de cellules CD146<sup>+</sup>.

L'utilisation des immunothérapies afin de combattre le cancer a été "l'avancée scientifique la plus significative en 2013", selon le palmarès 2013 des "découvertes les plus importantes de l'année" établi par la revue *Science* [294]. Ceci est la preuve que la recherche dans ce domaine est à son apogée et que les prochaines décennies vont être riches en nouvelles recherches afin d'améliorer leur efficacité. Nous pensons que les travaux sur l'implication de

CD146 dans migration des cellules immunes dans la tumeur peuvent représenter un intérêt dans ces avancées.

### 4.3 Conclusion générale.

En conclusion, mon projet de doctorat avait comme objectif général d'améliorer la caractérisation de l'infiltration immunitaire dans les tumeurs afin qu'elle puisse être utilisée comme indicateur pronostic de la maladie et permettre le développement de nouvelles thérapies.

Nous avons dans notre premier objectif, identifié la méthode de désagrégation par la Médimachine<sup>TM</sup> comme optimale afin de minimiser l'impact sur la biologie des TIIC en maintenant une viabilité convenable, minimisant la perte de détection des marqueurs de surface utiles à leur caractérisation phénotypique par CF et enfin en conservant la capacité de prolifération des cellules.

Dans notre deuxième objectif, nous avons adapté cette méthode à la caractérisation de la molécule d'adhérence CD146, cette molécule n'ayant jamais été caractérisée dans les cellules immunes infiltrant les tumeurs. Nous avons montré que le phénotype des cellules exprimant CD146 diffère du phénotype retrouvé dans les cellules immunes de patients souffrant de maladies auto-immunes soulignant ainsi des différences entre les microenvironnements auto-immuns et néoplasiques. Nous soupçonnons l'implication de cette molécule dans l'adhérence et la migration des cellules immunes pour la mise en place du contexte immunitaire dans la tumeur.

Ces travaux permettent de contribuer à des avancées en recherche fondamentale offrant de nouvelles pistes de réflexion quant à l'importance de la qualité du matériel biologique étudié en recherche, mais aussi un nouveau marqueur qui pourrait être ciblé lors du développement ou l'amélioration d'immunothérapies antitumorales.

## Bibliographie

1. Société canadienne du cancer, S.C., *Statistiques canadiennes sur le cancer 2013*. 2013.
2. Research, W.C.R.F.A.I.f.C., *Physical Activity and the Prevention of Colorectal Cancer*. Continuous Update Project Interim Report Summary, 2011. **Washington, DC: AICR**.
3. Travis, W.D., *Classification of lung cancer*. *Semin Roentgenol*, 2011. **46(3)**: p. 178-86.
4. Campeau, P.M., W.D. Foulkes, and M.D. Tischkowitz, *Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues*. *Hum Genet*, 2008. **124(1)**: p. 31-42.
5. Lebeau, A., et al., [*Invasive breast cancer: the current WHO classification*]. *Pathologie*, 2014. **35(1)**: p. 7-17.
6. Holland, R., et al., *Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification*. *Semin Diagn Pathol*, 1994. **11(3)**: p. 167-80.
7. Lopez-Beltran, A., et al., *2004 WHO classification of the renal tumors of the adults*. *Eur Urol*, 2006. **49(5)**: p. 798-805.
8. Fuhrman, S.A., L.C. Lasky, and C. Limas, *Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma*. *Am J Surg Pathol*, 1982. **6(7)**: p. 655-63.
9. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. *Ann Surg Oncol*, 2010. **17(6)**: p. 1471-4.
10. Nagtegaal, I.D., P. Quirke, and H.J. Schmolle, *Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care?* *Nat Rev Clin Oncol*, 2012. **9(2)**: p. 119-23.
11. Howson, C.P., T. Hiyama, and E.L. Wynder, *The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph*. *Epidemiol Rev*, 1986. **8**: p. 1-27.
12. Bruno, S., et al., *Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study*. *Hepatology*, 2007. **46(5)**: p. 1350-6.
13. Yang, H.I., et al., *Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. **100(16)**: p. 1134-43.
14. Kaplan, L.D., et al., *AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma in San Francisco*. *JAMA*, 1989. **261(5)**: p. 719-24.
15. Friedman-Kien, A.E., et al., *Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men*. *Ann Intern Med*, 1982. **96(6 Pt 1)**: p. 693-700.
16. Tabei, S.Z., *Human T Lymphotropic Virus (HTLV1) Related Diseases*. *Iran Red Crescent Med J*, 2011. **13(6)**: p. 374-6.
17. Brady, G., G.J. MacArthur, and P.J. Farrell, *Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma*. *J Clin Pathol*, 2007. **60(12)**: p. 1397-402.
18. Chu, E.A., et al., *Nasopharyngeal carcinoma: the role of the Epstein-Barr virus*. *Medscape J Med*, 2008. **10(7)**: p. 165.
19. Grange, C., et al., *Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation*. *J Immunol Methods*, 2011. **372(1-2)**: p. 119-26.

20. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
21. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
22. Beroukhi, R., et al., *The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers*. Nature, 2010. **463**(7283): p. 899-905.
23. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 643-9.
24. *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
25. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
26. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 611-22.
27. Davies, M.A. and Y. Samuels, *Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma*. Oncogene, 2010. **29**(41): p. 5545-55.
28. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323-30.
29. Curto, M., et al., *Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin*. J Cell Biol, 2007. **177**(5): p. 893-903.
30. Partanen, J.I., A.I. Nieminen, and J. Klefstrom, *3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc*. Cell Cycle, 2009. **8**(5): p. 716-24.
31. Reed, J.C., *Dysregulation of apoptosis in cancer*. J Clin Oncol, 1999. **17**(9): p. 2941-53.
32. Butler, A.A., et al., *Stimulation of tumor growth by recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) is dependent on the dose and the level of IGF-I receptor expression*. Cancer Res, 1998. **58**(14): p. 3021-7.
33. Ren, D., et al., *BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1390-3.
34. Vaupel, P., F. Kallinowski, and P. Okunieff, *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review*. Cancer Res, 1989. **49**(23): p. 6449-65.
35. Hockel, M. and P. Vaupel, *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(4): p. 266-76.
36. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
37. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4604-13.
38. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
39. Berx, G. and F. van Roy, *Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a003129.
40. Lin, C.Y., et al., *Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Sci, 2011. **102**(4): p. 815-27.
41. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.

42. Jones, R.G. and C.B. Thompson, *Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth*. *Genes Dev*, 2009. **23**(5): p. 537-48.
43. Kennedy, K.M. and M.W. Dewhirst, *Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation*. *Future Oncol*, 2010. **6**(1): p. 127-48.
44. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
45. Ehrlich, P., *Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. *Ned.Tijdschr. Geneeskde*, 1909. **5**: p. 273–290.
46. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. *Br Med J*, 1957. **1**(5022): p. 779-86.
47. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. *Prog Exp Tumor Res*, 1970. **13**: p. 1-27.
48. Stutman, O., *Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice*. *Science*, 1974. **183**(4124): p. 534-6.
49. Street, S.E., et al., *Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma*. *J Exp Med*, 2002. **196**(1): p. 129-34.
50. Shankaran, V., et al., *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
51. Smyth, M.J., et al., *Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma*. *J Exp Med*, 2000. **192**(5): p. 755-60.
52. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 137-48.
53. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-8.
54. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 329-60.
55. Novellino, L., C. Castelli, and G. Parmiani, *A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update*. *Cancer Immunol Immunother*, 2005. **54**(3): p. 187-207.
56. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. *Immunology*, 2007. **121**(1): p. 1-14.
57. Gollob, J.A., et al., *Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN- $\gamma$* . *Cancer Res*, 2005. **65**(19): p. 8869-77.
58. Wall, L., et al., *IFN- $\gamma$  induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(7): p. 2487-96.
59. Qin, Z., et al., *A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8 $^{+}$  T cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(14): p. 4095-100.
60. Takeda, K., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells*. *Nat Med*, 2001. **7**(1): p. 94-100.
61. Mori, S., et al., *The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent*. *Cancer Immunol Immunother*, 1997. **44**(5): p. 282-90.



62. Osborne BA., G.R., Kindt TJ., *Kuby Immunology*. New York: W.H. Freeman and Company, 2007. **6 ed.** .
63. Rammensee, H.G., T. Friede, and S. Stevanoviic, *MHC ligands and peptide motifs: first listing*. Immunogenetics, 1995. **41**(4): p. 178-228.
64. Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 86-9.
65. Yuseff, M.I., et al., *How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(7): p. 475-86.
66. Bhatia, A. and Y. Kumar, *Cancer-immune equilibrium: questions unanswered*. Cancer Microenviron, 2011. **4**(2): p. 209-17.
67. Drake, C.G., E. Jaffee, and D.M. Pardoll, *Mechanisms of immune evasion by tumors*. Adv Immunol, 2006. **90**: p. 51-81.
68. Kauffman, H.M., M.A. McBride, and F.L. Delmonico, *First report of the United Network for Organ Sharing Transplant Tumor Registry: donors with a history of cancer*. Transplantation, 2000. **70**(12): p. 1747-51.
69. Koebel, C.M., et al., *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 903-7.
70. Naumov, G.N., et al., *Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy?* Semin Cancer Biol, 2001. **11**(4): p. 271-6.
71. Holmgren, L., M.S. O'Reilly, and J. Folkman, *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*. Nat Med, 1995. **1**(2): p. 149-53.
72. Kyle, R.A., et al., *A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. N Engl J Med, 2002. **346**(8): p. 564-9.
73. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 836-48.
74. Farrar, J.D., et al., *Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2842-9.
75. Muller-Hermelink, N., et al., *TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis*. Cancer Cell, 2008. **13**(6): p. 507-18.
76. Baguley, B.C., *Tumor stem cell niches: a new functional framework for the action of anticancer drugs*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2006. **1**(1): p. 121-7.
77. Marincola, F.M., et al., *Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance*. Adv Immunol, 2000. **74**: p. 181-273.
78. Algarra, I., T. Cabrera, and F. Garrido, *The HLA crossroad in tumor immunology*. Hum Immunol, 2000. **61**(1): p. 65-73.
79. Chang, C.C., et al., *Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing machinery component down-regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1462-71.
80. Yee, C., et al., *Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and*

- antitumor effect of transferred T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16168-73.
81. Rouas-Freiss, N., et al., *HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism?* Cancer Res, 2005. **65**(22): p. 10139-44.
  82. Medema, J.P., et al., *Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11515-20.
  83. Mahmood, Z. and Y. Shukla, *Death receptors: targets for cancer therapy*. Exp Cell Res, 2010. **316**(6): p. 887-99.
  84. Griffith, T.S., et al., *Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 2833-40.
  85. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
  86. Zou, W. and L. Chen, *Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 467-77.
  87. Schmielau, J., M.A. Nalesnik, and O.J. Finn, *Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3 Suppl): p. 933s-939s.
  88. Thomas, D.A. and J. Massague, *TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance*. Cancer Cell, 2005. **8**(5): p. 369-80.
  89. Vence, L., et al., *Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20884-9.
  90. Pockaj, B.A., et al., *Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer*. Ann Surg Oncol, 2004. **11**(3): p. 328-39.
  91. Baratelli, F., et al., *Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1483-90.
  92. Gabilovich, D.I., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
  93. Wada, J., et al., *The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions*. Anticancer Res, 2009. **29**(3): p. 881-8.
  94. Terme, M., et al., *VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(2): p. 539-49.
  95. Godin-Ethier, J., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(22): p. 6985-91.
  96. Gannon, P.O., et al., *Androgen-regulated expression of arginase 1, arginase 2 and interleukin-8 in human prostate cancer*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12107.
  97. Fallarino, F., et al., *The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6752-61.
  98. Singh, R., et al., *Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells*. Cancer Res, 2000. **60**(12): p. 3305-12.

99. Porembaska, Z., et al., *Arginase in patients with breast cancer*. Clin Chim Acta, 2003. **328**(1-2): p. 105-11.
100. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 298-306.
101. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
102. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
103. Gao, Y., et al., *Molecular mechanisms underlying the regulation and functional plasticity of FOXP3(+) regulatory T cells*. Genes Immun, 2012. **13**(1): p. 1-13.
104. Duarte, J.H., et al., *Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions*. Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 948-55.
105. Gavin, M.A., et al., *Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 771-5.
106. Strauss, L., C. Bergmann, and T.L. Whiteside, *Functional and phenotypic characteristics of CD4+CD25highFoxp3+ Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer*. Int J Cancer, 2007. **121**(11): p. 2473-83.
107. Fife, B.T. and J.A. Bluestone, *Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 166-82.
108. McHugh, R.S., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 311-23.
109. Gobert, M., et al., *Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 2000-9.
110. Kleinewietfeld, M., et al., *CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2877-86.
111. Menning, A., et al., *Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets*. Eur J Immunol, 2007. **37**(6): p. 1575-83.
112. Mandapathil, M., et al., *Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression*. J Immunol Methods, 2009. **346**(1-2): p. 55-63.
113. Mandapathil, M., et al., *Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7176-86.
114. Mandapathil, M., et al., *CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4(+) T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Oncoimmunology, 2012. **1**(5): p. 659-669.
115. Duhon, T., et al., *Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells*. Blood, 2012. **119**(19): p. 4430-40.
116. Bergmann, C., et al., *Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(9): p. 1429-42.

117. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
118. Bergmann, C., et al., *T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(12): p. 3706-15.
119. Ben-Shoshan, J., et al., *Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha*. Eur J Immunol, 2008. **38**(9): p. 2412-8.
120. Popple, A., et al., *The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer*. Br J Cancer, 2012. **106**(7): p. 1306-13.
121. Burocchi, A., M.P. Colombo, and S. Piconese, *Convergences and divergences of thymus- and peripherally derived regulatory T cells in cancer*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 247.
122. Hodi, F.S., *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(18 Pt 1): p. 5238-42.
123. Camisaschi, C., et al., *LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)/CD25(high)/Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6545-51.
124. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 402-13.
125. Antonioli, L., et al., *CD39 and CD73 in immunity and inflammation*. Trends Mol Med, 2013. **19**(6): p. 355-67.
126. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 635-46.
127. Hilchey, S.P., et al., *Follicular lymphoma intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4051-61.
128. Strauss, L., et al., *A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4345-54.
129. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
130. Facciabene, A., et al., *Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells*. Nature, 2011. **475**(7355): p. 226-30.
131. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
132. Galon, J., W.H. Fridman, and F. Pages, *The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 1883-6.
133. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-102.
134. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.

135. Tartour, E., et al., *Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice*. *Cancer Res*, 1999. **59**(15): p. 3698-704.
136. Wilke, C.M., et al., *Th17 cells in cancer: help or hindrance?* *Carcinogenesis*, 2011. **32**(5): p. 643-9.
137. Schreck, S., et al., *Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma*. *Hematol Oncol*, 2009. **27**(1): p. 31-9.
138. DiLillo, D.J., K. Yanaba, and T.F. Tedder, *B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice*. *J Immunol*, 2010. **184**(7): p. 4006-16.
139. Mantovani, A., *B cells and macrophages in cancer: yin and yang*. *Nat Med*, 2011. **17**(3): p. 285-6.
140. Olkhanud, P.B., et al., *Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells*. *Cancer Res*, 2011. **71**(10): p. 3505-15.
141. Pages, F., et al., *In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(35): p. 5944-51.
142. Sica, A., P. Allavena, and A. Mantovani, *Cancer related inflammation: the macrophage connection*. *Cancer Lett*, 2008. **267**(2): p. 204-15.
143. Dieu-Nosjean, M.C., et al., *Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(27): p. 4410-7.
144. Galon, J., et al., *Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours*. *J Pathol*, 2014. **232**(2): p. 199-209.
145. Angell, H. and J. Galon, *From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer*. *Curr Opin Immunol*, 2013. **25**(2): p. 261-7.
146. Galon, J., et al., *Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force*. *J Transl Med*, 2012. **10**: p. 205.
147. Moloney, M. and W.G. Shreffler, *Basic science for the practicing physician: flow cytometry and cell sorting*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2008. **101**(5): p. 544-9.
148. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(1): p. 11-22.
149. Rosenberg, S.A., et al., *Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2*. *J Natl Cancer Inst*, 1994. **86**(15): p. 1159-66.
150. Rosenberg, S.A., et al., *Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2*. *JAMA*, 1994. **271**(12): p. 907-13.
151. Leach, D.R., M.F. Krummel, and J.P. Allison, *Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade*. *Science*, 1996. **271**(5256): p. 1734-6.
152. Brahmer, J.R., et al., *Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(19): p. 3167-75.
153. Weber, J., *Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade*. *Semin Oncol*, 2010. **37**(5): p. 430-9.

154. Brahmer, J.R., et al., *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(26): p. 2455-65.
155. Peggs, K.S., S.A. Quezada, and J.P. Allison, *Cancer immunotherapy: co-stimulatory agonists and co-inhibitory antagonists*. Clin Exp Immunol, 2009. **157**(1): p. 9-19.
156. Ferris, R.L., E.M. Jaffee, and S. Ferrone, *Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape*. J Clin Oncol, 2010. **28**(28): p. 4390-9.
157. Dhodapkar, K.M., et al., *Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 125-33.
158. Chang, B.A., et al., *Topical resiquimod promotes priming of CTL to parenteral antigens*. Vaccine, 2009. **27**(42): p. 5791-9.
159. Marshall, N.A., et al., *Immunotherapy with PI3K inhibitor and Toll-like receptor agonist induces IFN-gamma+IL-17+ polyfunctional T cells that mediate rejection of murine tumors*. Cancer Res, 2012. **72**(3): p. 581-91.
160. Kenter, G.G., et al., *Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia*. N Engl J Med, 2009. **361**(19): p. 1838-47.
161. Zajac, A.J., et al., *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2205-13.
162. Palucka, K. and J. Banchereau, *Human dendritic cell subsets in vaccination*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(3): p. 396-402.
163. Bonehill, A., et al., *Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6649-57.
164. Siders, W.M., et al., *Induction of specific antitumor immunity in the mouse with the electrofusion product of tumor cells and dendritic cells*. Mol Ther, 2003. **7**(4): p. 498-505.
165. Kono, K., et al., *Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T-cell responses in patients with gastric cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(11): p. 3394-400.
166. Fioretti, D., et al., *DNA vaccines: developing new strategies against cancer*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 174378.
167. Denis-Mize, K.S., et al., *Plasmid DNA adsorbed onto cationic microparticles mediates target gene expression and antigen presentation by dendritic cells*. Gene Ther, 2000. **7**(24): p. 2105-12.
168. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes*. Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
169. Dudley, M.E., et al., *Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(10): p. 2346-57.
170. Dudley, M.E., et al., *Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens*. J Clin Oncol, 2008. **26**(32): p. 5233-9.

171. Gattinoni, L., et al., *Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells.* J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 907-12.
172. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.* Science, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
173. Morgan, R.A., et al., *High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens.* J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3287-95.
174. Kalos, M., et al., *T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia.* Sci Transl Med, 2011. **3**(95): p. 95ra73.
175. Yvon, E., et al., *Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(18): p. 5852-60.
176. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *The chemokine superfamily revisited.* Immunity, 2012. **36**(5): p. 705-16.
177. Viola, A., et al., *The pros and cons of chemokines in tumor immunology.* Trends Immunol, 2012. **33**(10): p. 496-504.
178. Franciszkiewicz, K., et al., *Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response.* Cancer Res, 2012. **72**(24): p. 6325-32.
179. Baratelli, F., et al., *Pre-clinical characterization of GMP grade CCL21-gene modified dendritic cells for application in a phase I trial in non-small cell lung cancer.* J Transl Med, 2008. **6**: p. 38.
180. Singh, S., et al., *CXCR1 and CXCR2 silencing modulates CXCL8-dependent endothelial cell proliferation, migration and capillary-like structure formation.* Microvasc Res, 2011. **82**(3): p. 318-25.
181. Zlotnik, A., A.M. Burkhardt, and B. Homey, *Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(9): p. 597-606.
182. Qian, B.Z., et al., *CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis.* Nature, 2011. **475**(7355): p. 222-5.
183. Molon, B., et al., *Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells.* J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 1949-62.
184. Vestweber, D. and J.E. Blanks, *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands.* Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 181-213.
185. Ley, K., *The role of selectins in inflammation and disease.* Trends Mol Med, 2003. **9**(6): p. 263-8.
186. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment.* J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S97-103.
187. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
188. Schmidt, S., M. Moser, and M. Sperandio, *The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies.* Mol Immunol, 2013. **55**(1): p. 49-58.

189. Eriksson, E.E., et al., *Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 205-18.
190. da Costa Martins, P., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(5): p. 1023-9.
191. Alon, R., D.A. Hammer, and T.A. Springer, *Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 539-42.
192. Lawrence, M.B., et al., *Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E)*. J Cell Biol, 1997. **136**(3): p. 717-27.
193. Ley, K., *Arrest chemokines*. Microcirculation, 2003. **10**(3-4): p. 289-95.
194. Campbell, J.J., et al., *Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 255-66.
195. Kinashi, T., *Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 546-59.
196. Chan, J.R., S.J. Hyduk, and M.I. Cybulsky, *Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration*. J Exp Med, 2001. **193**(10): p. 1149-58.
197. Barreiro, O., et al., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. J Cell Biol, 2002. **157**(7): p. 1233-45.
198. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. J Cell Biol, 2004. **167**(2): p. 377-88.
199. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 327-34.
200. Dvorak, A.M. and D. Feng, *The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle*. J Histochem Cytochem, 2001. **49**(4): p. 419-32.
201. Bardin, N., et al., *Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(1): p. 16-21.
202. Dagur, P.K., et al., *CD146+ T lymphocytes are increased in both the peripheral circulation and in the synovial effusions of patients with various musculoskeletal diseases and display pro-inflammatory gene profiles*. Cytometry B Clin Cytom, 2010. **78**(2): p. 88-95.
203. Brucklacher-Waldert, V., et al., *Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis*. Brain, 2009. **132**(Pt 12): p. 3329-41.
204. Larochelle, C., et al., *Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system*. Brain, 2012. **135**(Pt 10): p. 2906-24.



205. Shih, I.M., et al., *Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes*. Am J Pathol, 1994. **145**(4): p. 837-45.
206. Xie, S., et al., *Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis*. Cancer Res, 1997. **57**(11): p. 2295-303.
207. Lehmann, J.M., G. Riethmuller, and J.P. Johnson, *MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 9891-5.
208. Shih, I.M., et al., *Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen*. Cancer Res, 1994. **54**(9): p. 2514-20.
209. Bardin, N., et al., *Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(1): p. 210-6.
210. Wu, G.J., et al., *Enforced expression of METCAM/MUC18 increases tumorigenesis of human prostate cancer LNCaP cells in nude mice*. J Urol, 2011. **185**(4): p. 1504-12.
211. Vainio, O., et al., *HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit<sup>+</sup> hemopoietic progenitors*. J Cell Biol, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1655-68.
212. Sers, C., et al., *Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8514-8.
213. Lehmann, J.M., et al., *Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000*. Cancer Res, 1987. **47**(3): p. 841-5.
214. Wang, Z. and X. Yan, *CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion*. Cancer Lett, 2013. **330**(2): p. 150-62.
215. Taira, E., et al., *Characterization of Gicerin/MUC18/CD146 in the rat nervous system*. J Cell Physiol, 2004. **198**(3): p. 377-87.
216. Guezguez, B., et al., *Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6673-85.
217. Bardin, N., et al., *Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration*. Thromb Haemost, 2003. **90**(5): p. 915-20.
218. Bardin, N., et al., *CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(5): p. 746-53.
219. Shih, I.M., et al., *A new Mel-CAM (CD146)-specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffin-embedded tissue*. Mod Pathol, 1998. **11**(11): p. 1098-106.
220. Shih, I.M., *The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 4-11.
221. Luca, M., et al., *Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells*. Melanoma Res, 1993. **3**(1): p. 35-41.
222. Liu, J.W., et al., *Hypermethylation of MCAM gene is associated with advanced tumor stage in prostate cancer*. Prostate, 2008. **68**(4): p. 418-26.

223. Yoshioka, S., et al., *Melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) is expressed on human luteinizing granulosa cells: enhancement of its expression by hCG, interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(6): p. 311-9.
224. Bardin, N., et al., *Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3677-84.
225. Simon, G.C., et al., *Up-regulation of MUC18 in airway epithelial cells by IL-13: implications in bacterial adherence*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **44**(5): p. 606-13.
226. Mangahas, C.R., et al., *Endothelin-1 upregulates MCAM in melanocytes*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(6): p. 1135-9.
227. Tsuchiya, S., et al., *Involvement of transforming growth factor-beta in the expression of gicerin, a cell adhesion molecule, in the regeneration of hepatocytes*. Int J Mol Med, 2007. **19**(3): p. 381-6.
228. Taira, E., et al., *Gicerin/CD146 is involved in neurite extension of NGF-treated PC12 cells*. J Cell Physiol, 2005. **204**(2): p. 632-7.
229. Wang, N., et al., *High glucose effect on the role of CD146 in human proximal tubular epithelial cells in vitro*. J Nephrol, 2008. **21**(6): p. 931-40.
230. Schon, M., et al., *Expression of gp130 in tumors and inflammatory disorders of the skin: formal proof of its identity as CD146 (MUC18, Mel-CAM)*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(2): p. 353-63.
231. Rummel, M.M., C. Sers, and J.P. Johnson, *Phorbol ester and cyclic AMP-mediated regulation of the melanoma-associated cell adhesion molecule MUC18/MCAM*. Cancer Res, 1996. **56**(9): p. 2218-23.
232. Pickl, W.F., et al., *MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes*. J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2107-15.
233. Elshal, M.F., et al., *CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2923-4.
234. Johnson, J.P., et al., *Melanoma progression-associated glycoprotein MUC18/MCAM mediates homotypic cell adhesion through interaction with a heterophilic ligand*. Int J Cancer, 1997. **73**(5): p. 769-74.
235. Shih, I.M., et al., *Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic Mel-CAM/ligand adhesion*. Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3835-40.
236. Liu, Q., et al., *Pre-eclampsia is associated with the failure of melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) expression by intermediate trophoblast*. Lab Invest, 2004. **84**(2): p. 221-8.
237. Liu, Q., et al., *Blockade of adhesion molecule CD146 causes pregnancy failure in mice*. J Cell Physiol, 2008. **215**(3): p. 621-6.
238. Tsukamoto, Y., et al., *Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in tracheal development and regeneration*. Cell Growth Differ, 1996. **7**(12): p. 1761-7.
239. Tsukamoto, Y., et al., *Adhesive activity of gicerin, a cell-adhesion molecule, in kidneys and nephroblastomas of chickens*. Cell Tissue Res, 1998. **292**(1): p. 137-42.

240. Tsukamoto, Y., et al., *Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in development and regeneration of oviduct and metastasis of oviductal adenocarcinomas of the chicken*. *Exp Cell Res*, 1999. **247**(2): p. 329-38.
241. Tsukamoto, Y., et al., *The role of gicerin, a novel cell adhesion molecule, in development, regeneration and neoplasia*. *Histol Histopathol*, 2001. **16**(2): p. 563-71.
242. Sorrentino, A., et al., *Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(8): p. 1035-46.
243. Tormin, A., et al., *CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization*. *Blood*, 2011. **117**(19): p. 5067-77.
244. Anfosso, F., et al., *Activation of human endothelial cells via S-endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125(FAK)*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(41): p. 26852-6.
245. Anfosso, F., et al., *Outside-in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(2): p. 1564-9.
246. Zigler, M., et al., *Expression of Id-1 is regulated by MCAM/MUC18: a missing link in melanoma progression*. *Cancer Res*, 2011. **71**(10): p. 3494-504.
247. Zhongde Ye, C.Z., Tao Tu, Min Sun, Dan Liu, Di Lu, Jing Feng, Dongling Yang, and X.Y. Feng Liu, *Wnt5a uses CD146 as a receptor to regulate cell motility and convergent extension*. *NATURE COMMUNICATIONS*, 2013.
248. Li, G., et al., *Reciprocal regulation of MelCAM and AKT in human melanoma*. *Oncogene*, 2003. **22**(44): p. 6891-9.
249. So, J.H., et al., *Gicerin/Cd146 is involved in zebrafish cardiovascular development and tumor angiogenesis*. *Genes Cells*, 2010. **15**(11): p. 1099-110.
250. Sers, C., G. Riethmuller, and J.P. Johnson, *MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread*. *Cancer Res*, 1994. **54**(21): p. 5689-94.
251. Yan, X., et al., *A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth*. *Blood*, 2003. **102**(1): p. 184-91.
252. Jiang, T., et al., *CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis*. *Blood*, 2012. **120**(11): p. 2330-9.
253. Zhuang, J., et al., *NADPH oxidase 4 mediates reactive oxygen species induction of CD146 dimerization in VEGF signal transduction*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(2): p. 227-36.
254. Elshal, M.F., et al., *A unique population of effector memory lymphocytes identified by CD146 having a distinct immunophenotypic and genomic profile*. *BMC Immunol*, 2007. **8**: p. 29.
255. Dagur, P.K., et al., *MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases*. *J Autoimmun*, 2011. **37**(4): p. 319-27.
256. Flanagan, K., et al., *Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40443.
257. Kamiyama, T., et al., *Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells*. *J Dermatol*, 2012. **39**(10): p. 838-42.
258. Despoix, N., et al., *Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(10): p. 2855-64.

259. Staquicini, F.I., et al., *A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans*. *Cancer Res*, 2008. **68**(20): p. 8419-28.
260. Sixt, M., et al., *Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(5): p. 933-46.
261. Wu, C., et al., *Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain*. *Nat Med*, 2009. **15**(5): p. 519-27.
262. Godin-Ethier, J., et al., *Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance*. *J Immunol*, 2009. **183**(12): p. 7752-60.
263. Novelli, M., et al., *Collagenase digestion and mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas*. *Clin Exp Dermatol*, 2000. **25**(5): p. 423-31.
264. Engelholm, S.A., et al., *Disaggregation of human solid tumours by combined mechanical and enzymatic methods*. *Br J Cancer*, 1985. **51**(1): p. 93-8.
265. Hamburger, A.W., C.P. White, and K. Tencer, *Effect of enzymatic disaggregation on proliferation of human tumor cells in soft agar*. *J Natl Cancer Inst*, 1982. **68**(6): p. 945-9.
266. Abuzakouk, M., C. Feighery, and C. O'Farrelly, *Collagenase and Dispase enzymes disrupt lymphocyte surface molecules*. *J Immunol Methods*, 1996. **194**(2): p. 211-6.
267. Russell, S.W., et al., *Inflammatory cells in solid murine neoplasms. I. Tumor disaggregation and identification of constituent inflammatory cells*. *Int J Cancer*, 1976. **18**(3): p. 322-30.
268. Zhang, Y.L., J.A. Frangos, and M. Chachisvilis, *Mechanical stimulus alters conformation of type I parathyroid hormone receptor in bone cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(6): p. C1391-9.
269. Goc, J., et al., *Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(12): p. e26836.
270. Dagur, P.K., et al., *Secretion of interleukin-17 by CD8+ T cells expressing CD146 (MCAM)*. *Clin Immunol*, 2014. **152**(1-2): p. 36-47.
271. Nakayamada, S., et al., *Helper T cell diversity and plasticity*. *Curr Opin Immunol*, 2012. **24**(3): p. 297-302.
272. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. *Nature*, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
273. Cosmi, L., et al., *Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor*. *J Exp Med*, 2008. **205**(8): p. 1903-16.
274. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
275. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(4): p. 759-67.
276. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(4): p. 263-74.
277. Chung, Y., et al., *Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling*. *Immunity*, 2009. **30**(4): p. 576-87.

278. Qi, W., X. Huang, and J. Wang, *Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment*. Cell Immunol, 2013. **285**(1-2): p. 18-22.
279. Greten, T.F., et al., *Human Th17 cells in patients with cancer: Friends or foe?* Oncoimmunology, 2012. **1**(8): p. 1438-1439.
280. Ji, Y. and W. Zhang, *Th17 cells: positive or negative role in tumor?* Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(7): p. 979-87.
281. Li, L. and V.A. Boussiotis, *The role of IL-17-producing Foxp3+ CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and colon cancer*. Clin Immunol, 2013. **148**(2): p. 246-53.
282. Muranski, P. and N.P. Restifo, *Essentials of Th17 cell commitment and plasticity*. Blood, 2013. **121**(13): p. 2402-14.
283. Lee, Y.K., et al., *Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 92-107.
284. Martin, F., L. Apetoh, and F. Ghiringhelli, *Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity?* Trends Mol Med, 2012. **18**(12): p. 742-9.
285. Wouters, B.G., et al., *Hypoxia as a target for combined modality treatments*. Eur J Cancer, 2002. **38**(2): p. 240-57.
286. Li, X.F., et al., *Visualization of hypoxia in microscopic tumors by immunofluorescent microscopy*. Cancer Res, 2007. **67**(16): p. 7646-53.
287. Vaupel, P., M. Hockel, and A. Mayer, *Detection and characterization of tumor hypoxia using pO2 histography*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(8): p. 1221-35.
288. Scott, P.A., et al., *Role of the hypoxia sensing system, acidity and reproductive hormones in the variability of vascular endothelial growth factor induction in human breast carcinoma cell lines*. Int J Cancer, 1998. **75**(5): p. 706-12.
289. Levy, A.P., N.S. Levy, and M.A. Goldberg, *Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia*. J Biol Chem, 1996. **271**(5): p. 2746-53.
290. Jeltsch, M., et al., *Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1423-5.
291. Bardin, N., et al., *S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen*. Tissue Antigens, 1996. **48**(5): p. 531-9.
292. Kang, Y., et al., *Knockdown of CD146 reduces the migration and proliferation of human endothelial cells*. Cell Res, 2006. **16**(3): p. 313-8.
293. Kilic, A., et al., *Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors*. J Surg Res, 2011. **167**(2): p. 207-10.
294. Couzin-Frankel, J., *Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy*. Science, 2013. **342**(6165): p. 1432-3.

## **Annexe I : Curriculum vitae**

### **FORMATION :**

- 2008-** Doctorat en Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Qc, CANADA
- 2006-2008** Master professionnel de Protéomique  
Université des Sciences et Technologies, Lille FRANCE
- 2005-2006** Licence de Génomique et Protéomique  
Université des Sciences et Technologies, Lille FRANCE
- 2004-2005** Diplôme d'Études Universitaires Général de Génomique et Protéomique  
Université des Sciences et Technologies, Lille FRANCE
- 2002-2004** Brevet de Technicien Supérieur en Biotechnologies  
Lycée Valentine LABBE, La Madeleine FRANCE
- 2002** Baccalauréat Sciences et Technologies de Laboratoire option Biochimie Génie  
Biologique  
Lycée Auguste Angellier, Dunkerque France
- 26-24 nov 2012** Formation BD Biosciences : Utilisation du LSR Fortessa

### **EXPERIENCE EN RECHERCHE :**

- 2008** Stage de Master 2  
Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle,  
INRA de Montpellier  
Sous la direction du Dr Michel Rossignol et Véronique Santoni.  
Titre du projet : Mise au point d'une technique de quantification des aquaporines  
d'*Arabidopsis thaliana* par spectrométrie de masse en mode MRM.  
Stage Master 2  
Laboratoire de neuroimmunologie des annélides  
IFR 17 INSERM Université des Sciences et Technologies de Lille  
Sous la direction du Dr Pierre Eric Sautière  
Titre du projet: Caractérisation de la progranuline chez les annélides.
- 2007** Stage de Master 1  
Laboratoire d'immuno-oncologie,  
Centre de Recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame,  
Sous la direction du Dr Réjean Lapointe.  
Titre du projet : Réponse cellulaire pan-spécifique contre influenza: nouvel outil  
de vaccination contre des antigènes conservés.
- 2005** Stage de Licence  
Laboratoire de virologie  
Centre Hospitalier Roger Salengro de Lille,  
Sous la direction du Dr Pierre Emmanuel Lobert et Dr Didier Hobert  
Titre du projet : Mise au point d'une technique de RT-qPCR afin d'étudier  
l'infection des cellules Hep-2 par le Cocksackivirus B4-E2.

**2003 2004** Stage de BTS  
L'Unité 508 INSERM  
Institut Pasteur de Lille  
Sous la direction du Dr Nicole Helbecque.  
Titre du projet : Étude de polymorphismes intervenant dans la maladie d'Alzheimer.

## **PUBLICATIONS**

**Grange C**, Létourneau J, Forget MA, Godin-Ethier J, Latour M, Liberman M, Martin J, Widmer H, Lattouf JB, Cailhier JF, Lapointe R. Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation. *Journal of Immunological Methods* 2011 Sep 30; 372(1-2):119-26.

Forget MA, Huon Y, Reuben A, **Grange C**, Liberman M, Martin J, Mes-Masson AM, Arbour N, Lapointe R Stimulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in mature human CD8+ T lymphocytes from blood and lung cancer tumors leads to a shared young/memory phenotype. *Plos one* 2012

Doucet JD, Forget MA, **Grange C**, Rouxel RN, Arbour N, von Messling V, Lapointe R. Endogenously-expressed influenza A M1 and NP proteins are efficiently presented by class-I and -II major histocompatibility complexes. *New Journal of General Virology* 2011 May; 92(Pt 5):1162-71.

## **BOURSES**

2013-2014 Bourse de rédaction Doctorat du programme Sciences Biomédicales 5000\$  
2012-2013 Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal d'une valeur de 7000\$  
2012-2013 Bourse de rédaction Doctorat du programme Sciences Biomédicales 2500\$  
2011-2012 Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal d'une valeur de 1749\$  
2011-2012 Bourse de rédaction Doctorat du programme Sciences Biomédicales 2500\$  
2010-2011 Bourse de l'Assemblée nationale du Québec de l'Institut du cancer de Montréal d'une valeur de 5000\$  
2010-2011 Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal d'une valeur de 3579\$  
2010-2011 Bourse de rédaction Doctorat du programme Sciences Biomédicales 2500\$  
2010-2011 Bourse du cancer du sein UdeM FCSQ d'une valeur de 5000\$  
2010 Bourse de voyage du Centre de Recherche du CHUM d'une valeur de 700\$  
2009-2010 Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal d'une valeur de 7000\$  
2008-2009 Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal d'une valeur de 3000\$

## **PRIX**

2011 Prix de présentation orale du 14<sup>ème</sup> congrès des étudiants du CRCHUM 1000\$  
(Meilleure présentation orale toute catégories)  
2010 Prix de présentation poster du 13<sup>ème</sup> congrès des étudiants du CRCHUM 500\$

## **COMMUNICATIONS ORALES**

- Grange C, Latour M, Cailhier JF, Lapointe R (8/11/2012) Caractérisation de l'immunité intra-tumorale dans les cancers communs: Étude de l'expression de CD146 dans les lymphocytes T, 22ème journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Canada.
- Grange C, Latour M, Liberman M, Martin J, Lattouf JB, Cailhier JF, Lapointe R (13/12/2011) Caractérisation de l'immunité intra-tumorale dans les cancers communs: Étude de l'expression de CD146 dans les lymphocytes T, 14ème congrès annuel des étudiants stagiaires du CRCHUM, Montréal, Canada.
- Grange C, Latour M, Liberman M, Martin J, Lattouf JB, Cailhier JF, Lapointe R (18/11/2011) Caractérisation de l'immunité intra-tumorale dans les cancers communs: Étude de l'expression de CD146 dans les lymphocytes T, 21ème journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Canada.
- Grange C, Cailhier JF, Lapointe R, (10/05/2011) Détermination d'une méthode optimale de désagrégation des tissus tumoraux : effet sur la biologie des cellules immunitaires infiltrantes, 79ème congrès de l'ACFAS.
- Grange C, Cailhier JF, Lapointe R, (12/11/2010) Détermination d'une méthode optimale de désagrégation des tissus tumoraux : effet sur la biologie des cellules immunitaires infiltrantes, 20ème journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Canada.
- Grange C, Cailhier JF, Lapointe R. (10/06/2010) Détermination d'une méthode optimale de désagrégation des tissus tumoraux : effet sur la biologie des cellules immunitaires infiltrantes, 1ière rencontre scientifique interaxe Réseau de recherche sur le cancer du FRSQ
- Grange C, Cailhier JF, Lapointe R, (27/02/2009) Caractérisation de l'immunité intra-tumorale dans les cancers du rein, sein et poumon, 19ème journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Canada.

## **COMMUNICATIONS PAR AFFICHE**

- Grange C, Latour M, Liberman M, Martin J, Lattouf JB, Cailhier JF, Lapointe R (5/12//2013). Étude de l'expression de CD146 dans les lymphocytes T intratumoraux, 16ème congrès annuel des étudiants stagiaires du CRCHUM, Montréal.
- Grange C, Cailhier JF, Lapointe R (24/10/2013) Characterization of intra-tumoral immunity in kidney cancer: CD146 expression in CD4 T lymphocytes, colloque annuel du CRCHUM, Montréal.
- Grange C, Cailhier JF, Lapointe R (13-15/06/2013) Characterization of intra-tumoral immunity in kidney cancer: CD146 expression in CD4 T lymphocytes, CCMA Symposium, Montréal.
- Grange C, Cailhier JF, Lapointe R (5-7/06/2013) Characterization of intra-tumoral immunity in kidney cancer: CD146 expression in CD4 T lymphocytes, 6ème Canadian cancer immunotherapy consortium, Toronto, Canada.
- Grange C, Latour M, Liberman M, Martin J, Lattouf JB, Cailhier JF, Lapointe R (18/12/2012) Caractérisation de l'immunité intra-tumorale dans les cancers communs:



Étude de l'expression de CD146 dans les lymphocytes T, 15ème congrès annuel des étudiants stagiaires du CRCHUM, Montréal.

- Grange C, Cailhier JF, Lapointe R. (27/10/2012) Characterization of intra-tumoral immunity in common cancer: CD146 expression in CD4 lymphocytes. 27th annual meeting of the Society for immunotherapy of Cancer, Bethesda M.D., USA.
- Grange C, Cailhier JF, Lapointe R. (14/04/2012) Characterization of intra-tumoral immunity in common cancer: CD146 expression in CD4 lymphocytes. 5ème Canadian cancer immunotherapy consortium, Montréal, Canada.
- Grange C, Létourneau J, Cailhier JF, Lapointe R. (16/12/2010) Caractérisation de l'immunité intra-tumorale dans les cancers. 13ème congrès annuel des étudiants stagiaires du CRCHUM, Montréal, Canada.
- Grange C, Létourneau J, Godin-Ethier J, Forget MA, Latour M, Liberman M, Martin J, Widmer H, Lattouf JB, Cailhier JF, Lapointe R. (2/09/2010) Establishing an optimal tumor tissue disaggregation method for human infiltrating immune cell characterisation. 25th annual meeting of the International Society for Biological Therapy of Cancer, Washington D.C., USA.
- Grange C, Létourneau J, Cailhier JF, Lapointe R. (16/12/2009) Caractérisation de l'immunité intra-tumorale dans les cancers 12ème congrès annuel des étudiants stagiaires du CRCHUM, Montréal, Canada.
- Grange C, Létourneau J, Cailhier JF, Lapointe R. (24/04/2009) Caractérisation de l'immunité intra-tumorale dans les cancers du rein, sein et poumon, 2ème Journée d'immunologie du CHUM, Montréal, Canada.
- Grange C, Létourneau J, Cailhier JF, Lapointe R. (19/03/2009) Caractérisation de l'immunité intra-tumorale dans les cancers du rein, sein et poumon 11ème congrès annuel des étudiants stagiaires du CRCHUM, Montréal, Canada.

## **DIVERS**

2009 à 2012 Bénévole au concert et au casino contre le cancer au profit de l'ICM

Nov 2011 Membre du comité organisateur de la 21ème journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal

2007-2008 Présidente de l'association des étudiants du master de Protéomique « Proté'Asso »

Nov 2007 Membre du comité organisateur de la journée de la protéomique de l'Université des Sciences et Technologies, Lille FRANCE

## **Annexe II : Manuscrit**

### **Stimulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway in Human CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes from Blood and Lung Tumors Leads to a Shared Young/Memory Phenotype**

PLoS One. 2012;7(7):e41074.

Marie-Andrée Forget, Yannick Huon Alexandre Reuben, Cécile Grange, Moïshe Liberman, Jocelyne Martin, Anne-Marie Mes-Masson, Nathalie Arbour, Réjean Lapointe.

#### **Contribution dans cet article:**

*Dans cet article, j'ai contribué au recrutement et au traitement des échantillons de tumeurs. J'ai également apporté des critiques lors de l'écriture du manuscrit.*

## Abstract

Cancer can be treated by adoptive cell transfer (ACT) of T lymphocytes. However, how to optimally raise human T cells to a differentiation state allowing the best persistence in ACT is a challenge. It is possible to differentiate mouse CD8<sup>+</sup> T cells towards stem cell-like memory (T<sub>SCM</sub>) phenotype upon TCR stimulation with Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation. Here, we evaluated if T<sub>SCM</sub> can be obtained from human mature CD8<sup>+</sup> T cells following TCR and Wnt/ $\beta$ -catenin activation through treatment with the chemical agent 4,6-disubstituted pyrrolopyrimidine (TWS119), which inhibits the glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), key inhibitor of the Wnt pathway. Human CD8<sup>+</sup> T cells isolated from peripheral blood or tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), and treated with TWS119 gave rise to CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> cells, indicative of early differentiated stage, also expressing CD127 which is normally found on memory cells, and CD133, an hematopoietic stem cell marker. T<sub>SCM</sub> cells raised from either TIL or blood secreted numerous inflammatory mediators, but in lower amounts than those measured without TWS119. Finally, generated T<sub>SCM</sub> CD8<sup>+</sup> T cells expressed elevated Bcl-2 and no detectable caspase-3 activity, suggesting increased persistence. Our data support a role for Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in promoting the T<sub>SCM</sub> subset in human CD8<sup>+</sup> T cells from TIL and the periphery, which are relevant for ACT.

## Introduction

Adoptive cell transfer (ACT) of manipulated mature autologous T lymphocytes in stage IV melanoma patients has shown beneficial effects [1], [2]. Although ACT are very promising anti-cancer therapies, there are still obstacles to circumvent such as expanding ACT to other solid cancers, improving anti-tumor efficacy, simplifying cell culture conditions, and importantly, increasing the persistence of transferred cells. Furthermore, long-term persistence is crucial to prevent cancer recurrence and therefore to establish a long-term anti-tumor memory response. Attempts to define optimal CD8<sup>+</sup> T cell phenotype for ACT have been deployed using different animal models. By comparing antigen-specific central memory CD8<sup>+</sup> T (T<sub>CM</sub>) and effector memory cells (T<sub>EM</sub>) for ACT, *Berger et al.* demonstrated that CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> cells could survive and persist longer after transfer and revert to the memory pool in primates [3]. In a mouse model, *Hinrichs et al.* obtained contrasting results by reporting that antigen-specific T cells originating from naive CD8<sup>+</sup> T cells (T<sub>N</sub>) were more suitable for ACT when compared to T<sub>CM</sub>. These conclusions were drawn based on an improved cytokine response from the T<sub>N</sub> post-transfer [4]. The persistence of effector CD8<sup>+</sup> T cells generated from T<sub>N</sub> was examined in a second study with human CD8<sup>+</sup> T cells and demonstrated the presence of longer telomeres and expression of CD27, suggesting a less differentiated T cell phenotype [5].

Recently, another CD8<sup>+</sup> T cell subset called stem cell memory T cells (T<sub>SCM</sub>) was proposed as a candidate for ACT. T<sub>SCM</sub> were first identified in a mouse model of human graft-versus-host disease [6]. These cells had the capacity of self-renewal and were shown to favor the development of chronic auto-immune responses. T<sub>SCM</sub> were defined by low levels of CD44, indicative of a naive phenotype, but elevated levels of CD62L, which is also expressed by T<sub>CM</sub>, as well as CD122 and Bcl-2. Surprisingly, T<sub>SCM</sub> were found to express Sca-1, a stem cell marker [6]. *Gattinoni et al.* later demonstrated that mouse tumor-specific anti-gp100 CD8<sup>+</sup> T cells treated with 4,6-disubstituted pyrrolopyrimidine (TWS119), a pharmacologic inhibitor of the glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), could generate a T<sub>SCM</sub> phenotype [7]. When evaluated in ACT in the gp100-expressing B16 melanoma mouse model, TWS119-induced T<sub>SCM</sub> mediated a better anti-tumor response when compared to T<sub>CM</sub> or T<sub>EM</sub>, and persisted in greater numbers than T<sub>CM</sub> one month post-transfer [7]. Induction of this T<sub>SCM</sub> phenotype was attributed to the activation of the canonical Wnt pathway following treatment with TWS119.

The same group recently reported that  $T_{SCM}$  naturally arise in humans, however, a link with the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway remains unknown and no stem-cell marker was identified in these cells [8]. Another study by Muralidharan *et al.* on peripheral and cord blood human T cells reported that activation of the Wnt pathway by either TWS119 or addition of Wnt-3a blocks differentiation in effector T cells [9].

Activation of the canonical Wnt pathway leads to the accumulation and translocation of  $\beta$ -catenin to the nucleus, which activates the transcription factors T cell factor (TCF) and lymphoid enhancer-binding factor (LEF). The latter is essential for preservation of hematopoietic stem cell functions and thymocyte maturation [10], [11], [12], [13]. However, importance of the Wnt pathway in mature T cells must be better defined. Recent studies in mice demonstrated a link between the development of  $CD8^+$   $T_{CM}$  cells and activation of the Wnt pathway through accumulation of  $\beta$ -catenin and TCF in  $T_{CM}$  but not in  $T_{EM}$  [14], [15]. Abolition of TCF expression did not impair the primary response to infections but impeded protection against further infections from the same pathogen. TCF was proven to be critical for secondary expansion of virus-specific  $CD8^+$  T cells and generation of  $T_{CM}$  precursors in mice [14].

Although the canonical Wnt pathway in memory  $CD8^+$  T cell development seems central in animal models, its relevance to human  $CD8^+$  T cell biology remains elusive. We therefore evaluated the phenotypic and functional impacts of Wnt pathway activation on human  $CD8^+$  T cells obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and from tumor infiltrating immune cells (TIIC). We demonstrate that activation of the Wnt pathway with TWS119 generates a population of  $CD8^+$  T cells showing a young/memory phenotype similar to the  $T_{SCM}$  previously described in mice. Furthermore, we report that activation of the Wnt pathway in human  $CD8^+$  T cells activates mechanisms that could improve the persistence of these cells by an overexpression of Bcl-2 and absence of active caspase-3.

## Materials and Methods

### Normal Donors and Patients

Normal donors were recruited at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Notre-Dame Hospital (Montréal, Canada). Normal donors and lung cancer patients signed an informed consent approved by the Scientific and ethics review committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center (CRCHUM). Blood samples were collected (preceding surgery for patients) and PBMC were isolated following centrifugation with lymphocyte separation medium (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada).

Clinical samples from lung tumors were collected shortly after resection (less than 1 hour after surgical resection) and immersed in *Iscove's modified Dulbecco's medium* (Invitrogen, Carlsbad, CA). For flow cytometry analysis (FACS), tumor infiltrating immune cells (TIIC) were isolated by mechanical homogenization using a Medimachine™ (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) followed by centrifugation of the resulting single-cell suspension with lymphocyte separation medium (Wisent) [16]. For cell culture, TIIC were isolated by enzymatic digestion as previously described, followed by centrifugation with lymphocyte separation medium [17]. Briefly, tumor samples were sliced in to 1 mm<sup>2</sup> fragments and digested overnight at room temperature in 10 mL of *RPMI 1640* (Wisent) with type IV collagenase, hyaluronidase, DNase (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 100 U/mL of penicillin/streptomycin and 10 µg/mL of gentamicin (Wisent). Digestion was done on a rotating plate at 50 rpm. Recovered TIIC were resuspended in complete *Iscove's modified Dulbecco's medium* supplemented with 7,5% of AB human serum (Gemini Bio-Products, Calabasas, CA), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL of penicillin/streptomycin and 10 µg/mL of gentamicin (Iscove), for 18 to 20 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> to allow re-expression of faded markers caused by collagen treatment.

## **Culture of CD8<sup>+</sup> T Cells from Normal Donor PBMC or from TIIC**

CD8<sup>+</sup> T cells from PBMC were prepared with *EasySep Negative Selection Human CD8<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit* (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) as recommended by the manufacturer. CD8<sup>+</sup> T cells from TIIC were prepared with *EasySep Positive Selection Human CD8<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit* (STEMCELL Technologies Inc.) to eliminate cancer cells (>98% purity).

Purified CD8<sup>+</sup> T cells from either PBMC or from TIIC were cultured in 96-well plates coated with an antibody specific to CD3 (*OKT3*, eBioscience, San Diego, CA; 1 µg/mL for at least 6 h at 4°C or 5 µg/mL for 2 h at 37°C). CD8<sup>+</sup> T cells were divided into two groups which both received 300 U/mL of IL-2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) on day 0. One group also received a concentration of 5 µM of TWS119 (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), the other group received an equivalent volume of vehicle alone (DMSO). Additional groups were added for dose-response experiments with concentrations ranging from 0.5 to 2.5 µM of TWS119. Cells were cultured for five days in Iscove at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Complete Iscove's medium and 600 U/mL of IL-2 were added on day three of culture. After 5 days, CD8<sup>+</sup> T cells were harvested for either cell surface staining with FACS antibodies or overnight stimulation for cytokine release assays (as below).

## **Flow Cytometry**

These antibodies were used for cell staining: CD8-Pacific Blue (PB), CD3-Alexa Fluor 700, CD127-Phycoerythrin (PE), CD45RA-Phycoerythrin Cy7 (PECy7), CD62L-Phycoerythrin Cy5 (PECy5) (all from BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and CD133-APC (eBioscience). Matched isotype controls were used for each antibody to define background levels. Dead cells were excluded from analysis with the *Live/Dead Fixable Dead Cell* kit (Invitrogen). Cell surface staining was performed as described previously [18]. Sample acquisition was performed on a BD Biosciences

LSRII instrument and analysis was done using *FlowJo software* (Tree Star). Mean fluorescence intensity (MFI) was calculated on positively stained cells.

### **Cytokine Release Assays**

In the case of multiplex cytokine detection assays, cells were stimulated for 20 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in 96-well plates coated with anti-CD3 (OKT3) and 1 µg/mL of soluble anti-CD28 (BD Biosciences). Supernatants were harvested for cytokine secretion assays by Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences), or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). CBA was performed according to the instruction manual of BD Cytometric Bead Array Human Soluble Protein Master Buffer Kit, for these secreted factors: IL-1β, -2, -4, -5, -6, -7, -9, -10, -12p70, -13, -17a, -21, IFN-γ, GM-CSF, LT-α, TNF, TNF-RI, TNF-RII, CD40L, FasL (CD178), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) and VEGF. Sample acquisition was performed on a BD Biosciences LSR Fortessa instrument and analysis was done with the FCAP Array software (BD Biosciences). For the human IFN-γ ELISA, 96-well plates (MaxiSorp by Nalge Nunc International, Rochester, NY) were coated overnight with 0.4 µg/mL of anti-IFN-γ antibody (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) at 4°C. Plates were washed once with PBS/0.5% tween and blocked for 30 min with PBS with 5% FBS. Plates were washed four times and incubated for 90 min with 0.2 µg/mL of secondary biotinylated anti-IFN-γ antibody (Pierce Biotechnology) and culture supernatants. Plates were washed four times and incubated for 35 min with 0.3 µg/mL of Poly HRP20-streptavidin (Fitzgerald Industries International Inc., Concord, MA). After four washes, plates were revealed with TMB substrate (Neogen, Lexington, KY) and reaction was stopped using 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. MIP-1β ELISA was performed according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN). Cytokine secretion was considered positive and specific when values were above 50 pg/mL and double the value of the negative control.



## Western Blotting

Freshly isolated CD8<sup>+</sup> T cells from healthy donors' PBMC were stimulated in a 96-well plate pre-coated with anti-CD3 (1 µg/mL) and 1 µg/mL of soluble anti-CD28, with or without TWS119 (5 µM) and harvested after 6 h of incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) for β-catenin expression analysis. For Bcl-2 and activated caspase-3 assessment, CD8<sup>+</sup> T cells were activated for five days as described earlier, with or without 5 µM of TWS119. Following protein extract preparation and quantification as previously described [19], 15–20 µg protein were resolved on 7.5% SDS-PAGE for β-catenin and 15% for Bcl-2 and cleaved caspase-3, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were incubated with specific antibodies for β-catenin (mouse anti-β-catenin [IgG1] BD Biosciences, 1/1 000), for Bcl-2 (mouse anti-Bcl-2 [IgG1] Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, 1/10 000) or for caspase-3 (rabbit anti-caspase-3 [IgG] Santa Cruz Biotechnology Inc, 1/5 000) and for β-actin (mouse anti-β-actin [IgG1] Abcam, 1/75 000). Antibodies were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc, 1/10 000 [for β-catenin, Bcl-2 and caspase-3] and 1/75 000 [for β-actin]). A peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc) was used at 1/10 000 for cleaved caspase-3. Proteins were detected using Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). For Bcl-2, signal intensity was determined by densitometry using Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA). Basic signal was corrected for background for each band and Bcl-2 densitometric values normalized to β-actin.

## Statistics

In CBA assays, experimental data are reported as mean ± SEM. Statistical analyses were performed by the nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank test to compare two groups. Statistical analyses were made using Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). P values lower than 0.05 were considered significant.

## Results

### Activation of the Wnt Pathway Leads to the Differentiation of Mature Peripheral Human CD8<sup>+</sup> T Cells into a Shared Naive, Memory and Stem Cell Phenotype

The Wnt pathway is central in multiple differentiation processes and is activated by the pharmacological compound TWS119, which binds to and inhibits GSK-3 $\beta$  [20]. In mice, Gattinoni et al. reported that activation of the Wnt pathway with TWS119 in mature anti-gp100 CD8<sup>+</sup> T cells generated TSCM cells, with a phenotype shared by TN, TCM and stem cells [7]. However, Muralidharan et al. reported that activation of the Wnt pathway in mature human CD8<sup>+</sup> T cells blocked naive to effector transition [9] without emphasizing the young memory phenotype reported by Gattinoni et al. [7], [8], [21]. We thus isolated CD8<sup>+</sup> T cells from circulating blood of healthy donors and activated them with anti-CD3 and IL-2 to mimic TCR activation, in the presence or absence of TWS119 for five days. As expected, treatment with TWS119 stabilized  $\beta$ -catenin in human activated CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 1A). Following activation, phenotypic profile of total CD8<sup>+</sup> T cells was established using flow cytometry analysis (FACS). At the time of this current study, TSCM have yet only been reported in mice [6], [7], therefore we selected their human ortholog CD45RA and CD62L to evaluate the impact of Wnt pathway activation on shared TN and TCM human CD8<sup>+</sup> T cell phenotypes. As shown in Figure 1B, activation of CD8<sup>+</sup> T cells combined with TWS119 treatment (Figure 1B, right dot plot) resulted in distinct populations when compared with activated CD8<sup>+</sup> T cells without TWS119 (Figure 1B, center dot plot) with a defined CD45RA<sup>hi</sup>/CD62L<sup>+</sup> population (gate A) of CD8<sup>+</sup> T cells. This three-fold increase in population A was observed in cells from all healthy donors treated with TWS119 (Figure 1C). For the other populations, T cell activation with TWS119 resulted in marginal differences in the percentage of cells (population D) or in more (population E) or less (populations B and C) of a decrease.

To further characterize the impact of Wnt activation on human CD8<sup>+</sup> T cell phenotype, expression of the IL-7 $\alpha$  receptor (CD127) was evaluated as a marker for persisting and/or memory cells [22]. In addition, expression of the CD133 molecule was also investigated as a putative stem cell marker [23]. CD133 expression has previously been partly linked to Wnt pathway activation in human fetal aorta progenitor cells, but remains unexplored in human T

cells [24]. As presented in Figure 2A (left) and 2B (Total population), activation of CD8<sup>+</sup> T cells for five days combined with TWS119 treatment resulted in both increased percentage and intensity of CD127 (Figure S1, left). Although we observed some variability between healthy donors, expression of CD127 was increased in all defined populations from Figure 1B according to CD45RA and CD62L expression. This increase (Figure 2B) was even observed in population E (CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>), considered of effector phenotype in which most CD8<sup>+</sup> T cells do not normally express CD127. This demonstrated an impact of Wnt pathway activation even in differentiated cells. Similar observations were made for CD133 (Figure 2C and Figure S1, right). However, CD133 was absent from the CD62L-negative population (populations D and E in Figure 2C). As illustrated in population A (Figure 2D), a high percentage of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD45RA<sup>hi</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> is generated when TWS119 is added to cultures. This indicates that by activating the Wnt pathway in human CD8<sup>+</sup> T cells, it is possible to induce a T<sub>SCM</sub>-like phenotype. Such treatment also increases co-expression of CD127 and CD133 in CD8<sup>+</sup> T CD45RA<sup>int</sup>/CD62L<sup>+</sup> and CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>+</sup> cells (respectively populations B and C in Figure 2D).

### **TWS119 Dose-response and CD8<sup>+</sup> T<sub>SCM</sub> Establishment**

We next elected to determine whether the Wnt pathway modifies CD8<sup>+</sup> T cell expansion. As shown in Figure 3A, high concentrations of TWS119 impair human CD8<sup>+</sup> T cell expansion, which is also observed in mice [7]. Despite a lower number in the total cell number raised, the absolute number of T<sub>SCM</sub>-like cells may be higher following TWS119 treatment due to the increase in the proportion of these cells. This T<sub>SCM</sub>-like phenotype increase cannot be attributed to death of other T cell types (populations B to E) since the number of dead cells was similarly low in both groups whether treated or not with TWS119, with some donor-specific variability (Figure S2).

To overcome this apparent lack of expansion in the total cell population, peripheral blood human CD8<sup>+</sup> T cells were activated for five days in a dose-response of TWS119 (0.5 to 5 μM) to find an intermediate concentration allowing T<sub>SCM</sub> differentiation and exerting minimal impact on cell number. As presented in Figure 3B, distinct CD45RA<sup>hi</sup>/CD62L<sup>+</sup> (population A as defined in Figure 1B) peaked with 2.5 and 5 μM TWS119. This was

observed for most healthy donors (Figure 3C). Donors with a conserved CD45RA<sup>hi</sup>/CD62L<sup>+</sup> phenotype from 2.5 to 5  $\mu$ M concentration also showed a lack of expansion potential with 2.5  $\mu$ M (Figure S3). Considering the variations between healthy donors obtained in our cultures with lower doses of TWS119 and absence of specific toxicity, 5  $\mu$ M of TWS119 appeared optimal to preserve the T<sub>SCM</sub>-like phenotype acquired following Wnt pathway activation, but cells poorly proliferated at this concentration.

Increased concentration of TWS119 was also linked to an increase of CD127 in total CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 3D and Figure S4 for MFI) but also in all sub-populations defined in Figure 1B (populations A to E, Figure 3D). Again, these data confirmed that 5  $\mu$ M of TWS119 is optimal to induce the shared naive/memory/stem T<sub>SCM</sub>-like phenotype, in combination with IL-2.

### **Impact of Wnt Pathway Activation on Human CD8<sup>+</sup> T Cell Functions**

Since the Wnt pathway mediated major changes in the phenotype of human CD8<sup>+</sup> T cell, we elected to investigate whether this pathway also impacts on CD8<sup>+</sup> T cell functionality. To fully establish the polyfunctional secretion profile, peripheral blood human CD8<sup>+</sup> T cells were activated for five days with or without TWS119 and restimulated overnight with agonist anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Supernatants were collected and assayed for the presence of 27 different cytokines/chemokines/immune mediators. As presented in Figure 4, activation of the Wnt pathway in CD8<sup>+</sup> T cells diminished the secretion of effector cytokines, chemokines and modulators such as IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF, sTNFR<sub>II</sub>, MIP-1 ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and RANTES, but increased IL-2 secretion for the majority of donors. Results for IFN- $\gamma$  and MIP-1 $\beta$  were confirmed by ELISA assays (data not shown). Activation of CD8<sup>+</sup> T cells also led to production of Th2 cytokines IL-13 and IL-5, which was noticeably diminished in the presence of TWS119. The shift from a clear effector profile to a less differentiated profile combined with secretion of IL-2 is consistent with the young/memory phenotype generated by the activation of the Wnt pathway in human CD8<sup>+</sup> T cells.

## Activation of the Wnt Pathway in Human Tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T Cells Generates a T<sub>SCM</sub>-like Population

One of the challenges in the treatment of cancer patients by ACT is to enhance the survival of transferred anti-tumor T cells. Tumor infiltrating T lymphocytes (TIL) have been shown to be more efficient in ACT, but mostly display an activated and further differentiated phenotype (CD45RO<sup>+</sup>, MHC class II<sup>+</sup>) [25] and the majority of these cells are CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup> (Figure 5A). We thus evaluated whether activation of the Wnt pathway could revert CD8<sup>+</sup> TIL to a less differentiated phenotype. As shown in Figure 5B, human CD8<sup>+</sup> TIL prepared from lung cancer patients and activated (anti-CD3/IL-2) in the presence of TWS119 for five days displayed a distinct population of CD45RA<sup>int</sup>/CD62L<sup>+</sup> cells. This observation was consistent with all four lung cancer patients (Figure 5B, right panel). We also observed variability in TIL viability from patient to patient (Figure S5). Because the viability appeared patient-dependent, we believe that the dose used for TWS119 treatment (5 μM) was not the cause of viability issues. Other factors such as susceptibility of TIL to cell death-activation as a consequence of higher doses of anti-CD3 could also be the cause of cell death observed with some TIL.

Similarly, a greater proportion of CD8<sup>+</sup> TIL activated in the presence of TWS119 acquired CD127 and CD133 compared to activated cells without the Wnt pathway activator (Figure 5C and D). Also, to a lesser extent, treatment of TIL with TWS119 increased their CD133 expression (Figure 5C right and 5D right). Interestingly, the CD45RA<sup>int</sup>/CD62L<sup>+</sup> population observed following TWS119 treatment contained a substantial cell population (20–62%) co-expressing CD127 and CD133 (Figure 5E, top panels), which corresponds to a T<sub>SCM</sub>-like phenotype (CD45RA<sup>int</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>). Finally, TWS119 failed to upregulate CD133 in CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup> cells but still caused an increase in CD127 (Figure 5E, bottom panels).

In summary, activation of CD8<sup>+</sup> lung TIL in the presence of TWS119 gives rise to a distinct cell population with a T<sub>SCM</sub> phenotype (CD45RA<sup>int</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>) when compared to basic CD3/IL-2 activation. Activation of the Wnt pathway in TIL also resulted in

higher expression of CD127 in CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TIL, which may confer a higher capacity to persist following transfer in patients.

### **The Wnt Pathway Changes Human Tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T Cell Functionality**

Global secreted factors were analyzed from Wnt-activated human tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells. CD8<sup>+</sup> lung TIL were activated with or without TWS119 for five days and restimulated overnight with agonist anti-CD3 and anti-CD28. Supernatants were then collected to evaluate 27 different cytokines/chemokines/secreted factors. As presented in Figure 6, activation of the Wnt pathway in CD8<sup>+</sup> T cells diminished the secretion of some effector cytokines such as IFN- $\gamma$ , GM-CSF, MIP-1 ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and RANTES when compared with anti-CD3 activation without TWS119. Results for IFN- $\gamma$  were validated by ELISA (data not shown). Some cytokines showed a distinct response to TWS119; TNF production was higher when anti-CD3 was combined to TWS119, and TWS119 alone increased IL-6 and IL-8 secretion with or without anti-CD3 stimulation. Activation of CD8<sup>+</sup> lung TIL also led to production of IL-13 and IL-5, which were noticeably diminished in presence of TWS119 as observed with peripheral CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 4). Collectively, Wnt/ $\beta$ -catenin activation led to a decreased production of pro-inflammatory cytokines which is consistent with less differentiated T cell functions, but also increased the production of IL-6, IL-8, and TNF.

### **Wnt/ $\beta$ -catenin Activation Increases Bcl-2 and Inhibits Caspase-3 Cleavage**

Expression of CD127 is presumed to enhance cell survival [22]. Accordingly, treatment of human CD8<sup>+</sup> T cells with TWS119 not only increased CD127 expression (Figure 2B and 5D) but also enhanced levels of anti-apoptotic protein Bcl-2 expression (Figure 7A and B), a protein protecting from programmed cell death or apoptosis. Furthermore, absence of cleaved caspase-3 (active form) in CD8<sup>+</sup> T cells treated with TWS119 (Figure 7A) emphasized the idea that activation of the Wnt pathway protected these cells from apoptosis. The nearly 2-fold increase in Bcl-2 combined with the absence of cleaved caspase-3 strongly suggests an enhancement in survival potential mediated by Wnt pathway activation in CD8<sup>+</sup> T cells. With increased Bcl-2 and absence of detectable caspase-3 activity following TWS119 treatment, cells demonstrated enhanced survival.

## Discussion

Perspectives for cancer treatment by ACT seem very promising but there are still obstacles to overcome, one of them being the persistence of cells following transfer. Long-term persistence is desirable to establish passive transfer of memory response, and consequently avoid cancer recurrence. In an attempt to provide solutions to this problem and to better understand the complex biology of T lymphocyte differentiation, we studied the impact of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation on human CD8<sup>+</sup> T cells. This pathway has been shown to be important in the establishment of central memory T cells and for prolonged persistence of mouse CD8<sup>+</sup> T cells following transfer in the B16 mouse model and peptide vaccination [7], [14], [15]. We report here that activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by treatment with TWS119 generates cells with a shared phenotype between T<sub>N</sub>, T<sub>CM</sub> and stem cells, similar to T<sub>SCM</sub> previously described in mice, in human CD8<sup>+</sup> T cells from peripheral blood, and for the first time from TIL. As for the effect of TWS119 on peripheral CD8<sup>+</sup> T cells, this report differs in part from the study by Muralidharan *et al.*, which focuses on the naive to effector transition. Also, culture conditions differ in our study; they used lower concentrations of TWS119 without exogenous cytokines for a 7-day culture period [9]. Our cultures included cytokines such as IL-2, which should provide T cell survival signals. Also, our study focused on the impact of Wnt pathway activation in the generation of human T<sub>SCM</sub>-like phenotype, as opposed to the previous study [9]. We also demonstrated the impact of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation in cells with a more differentiated profile found in peripheral blood and TIL. These T<sub>SCM</sub>-like cells expressed elevated levels of molecules such as the IL-7 $\alpha$  receptor and Bcl-2, in the absence of active caspase-3, supporting the notion that they bear enhanced survival properties.

A recent study reported rare T<sub>SCM</sub> CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell populations (2–3% of all circulating T lymphocytes) naturally arising in humans [8]. However, Gattinoni *et al.* established no link between the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and this naturally-arising T<sub>SCM</sub> phenotype in humans, and did not report stem cell markers. In our study, the hematopoietic stem cell maker CD133 was clearly expressed on a substantial fraction of T<sub>SCM</sub> cells raised with TWS119 treatment, with an apparent link with expression of CD62L, which we did not

further characterize. Also, it was not clear what was the proliferative capacity of human T<sub>SCM</sub>. Whether putative naturally-arising T<sub>SCM</sub> described in Gattinoni *et al.* and the Wnt/ $\beta$ -catenin-activated CD8<sup>+</sup> T cells we describe are the same population remains to be confirmed in humans, and considering their published microarray data, it is unlikely since Wnt-pathway targeted genes remained unchanged. However, human cells with these attributes have an improved persistence capacity when adoptively-transferred into a xenogeneic mesothelioma mouse tumor model [8].

TWS119 capacity to activate the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway was already recognized in mice [7], [20], but only one study reported its effect on human cells [26]. Specifically, TWS119 is an inhibitor of GSK-3 $\beta$ , which itself inhibits the canonical Wnt pathway. Here, we have shown that treatment of human CD8<sup>+</sup> T cells with TWS119 induced an accumulation of  $\beta$ -catenin (Figure 1A), as recently reported by Muralidharan *et al.* [9] We also observed a slight increase in  $\beta$ -catenin following anti-CD3/IL-2 activation, as previously reported by Lovatt and Bijmaker who demonstrated in human mature T cells that stimulation of the TCR (anti-CD3 and anti-CD28) leads to  $\beta$ -catenin stabilization early after activation [27]. This concurs with reports of GSK-3 inactivation upon TCR stimulation [28]. Interestingly, GSK-3 $\beta$  is also involved in other pathways, including cellular metabolism, cell cycle progression, neuroprotection and the mTOR pathway [29], [30]. It is therefore plausible that TWS119 affects other pathways in addition to stabilizing  $\beta$ -catenin, which could explain the T<sub>SCM</sub> phenotype. However, it is unlikely that TWS119 engages the mTOR pathway after GSK-3 $\beta$  inhibition, since mTOR engagement classically leads to proliferation, which does not happen when human CD8<sup>+</sup> T cells are treated with TWS119, considering they fail to expand (Figure 3A). Moreover, activation of the Wnt pathway seems to dominate over activation of the mTOR pathway [31]. Furthermore, introduction of stable  $\beta$ -catenin in peripheral mouse primary T cells inhibited proliferation and cytokine secretion after TCR stimulation and blunted effector cell differentiation [32]. However, the same groups reported that the sole stabilization and expression of  $\beta$ -catenin may not be sufficient to lead to a T<sub>SCM</sub> phenotype; it is therefore possible that other pathways involving GSK-3 $\beta$  may be essential [33]. Consequently, as the sole involvement of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway for T<sub>SCM</sub> differentiation has been a matter of debate (Driessens, Correspondence to the editor, Nat Med, 2010 and Reply



from Gattinoni Nat Med, 2010) [33], importance of this pathway requires further investigation, even though it has been replicated in other mouse models [14], [15]. Still, although in addition to  $\beta$ -catenin other pathways may be engaged, GSK-3 $\beta$  inhibition by TWS119 resulted in a T<sub>SCM</sub> phenotype in human T CD8<sup>+</sup> cells.

We also observed an increase in IL-7 $\alpha$  receptor expression in the total population of CD8<sup>+</sup> T cells, independently of their source (Figure 2B, 5D and Figure S1A). Cells expressing high CD127 levels are known to have the highest capacity to become long persisting memory cells. During an efficient immune response, they represent a small subset during the peak of response but persist after contraction [22], [34]. TWS119 differentiates CD8<sup>+</sup> TCM-like cells (CD62L<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup>), but also increases CD127 expression in populations that would be considered differentiated effectors with limited life expectancy, based on absence of CD62L and CD45RA expression [35]. CD133 expression represents a hallmark marker of hematopoietic stem cells, and is also expressed as an early myogenic marker [36], but has never been reported in mature T lymphocytes. Thus, as CD133 may be a unique TSCM marker, further characterization of this population is required.

The CD8<sup>+</sup> T<sub>SCM</sub>-like cells we generated from both PBMC and TIL secreted a wide array of cytokines, a concept referred to as polyfunctionality. It has recently been demonstrated in mouse models, that while fully differentiated highly proliferating effector CD8<sup>+</sup> T cells are mostly IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/TNF<sup>-</sup> following antigen recognition, less differentiated cells are more likely to be IL-2<sup>+</sup>/TNF<sup>+</sup> with progressive acquisition of IFN- $\gamma$  [37]. Although our study was performed in humans, there are similarities regarding the partial loss of IFN- $\gamma$  production combined to gain of IL-2 production following activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in peripheral human CD8<sup>+</sup> T cells, also observed in human CD8<sup>+</sup> TIL. Similar observations were made previously [9] on decreased IFN- $\gamma$  secretion by T cells treated with TWS119, with a weak decrease in TNF production, although they observed appreciable amounts of IL-2 independently of Wnt pathway activation. Conversely, we demonstrated that Wnt activation in human CD8<sup>+</sup> TIL increased TNF production compared to non-TWS119 treated controls. Comparison remains suboptimal since TIL are already activated and display a different biology compared to peripheral T cells.

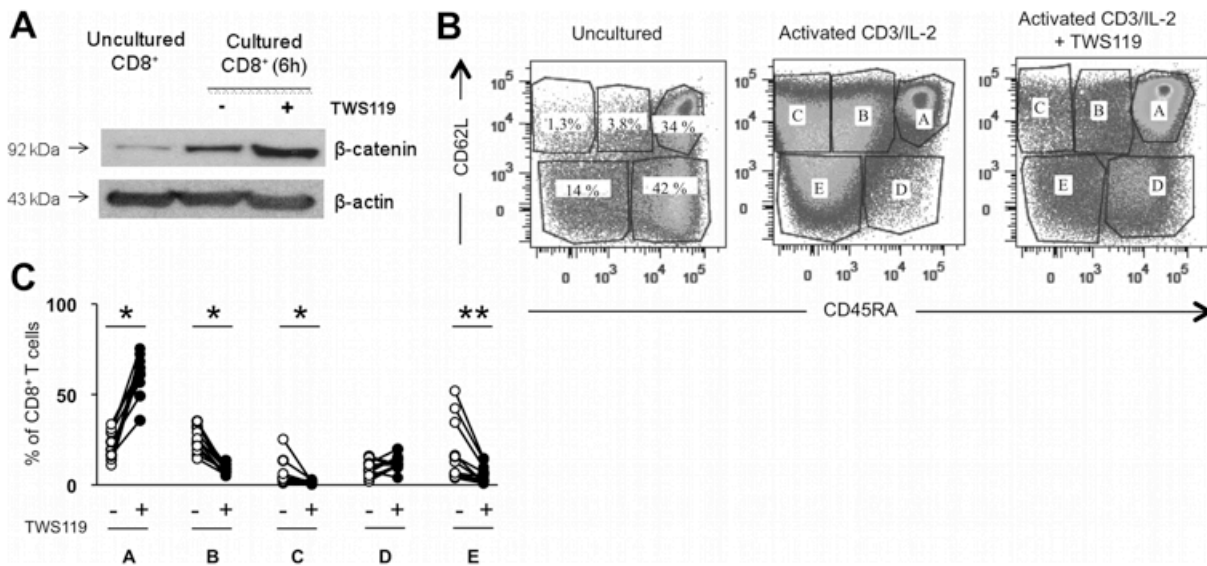
Although we cannot exclude that inhibition of GSK-3 could lead to activation of the nuclear factor of activated T cell (NF-AT) pathway, thus leading to secretion of IL-2 by CD8<sup>+</sup> T cells, activation of this pathway is unlikely because it would also result in T cell proliferation, which does not concur with our results [28], [38]. Globally, when looking at the diversity of secreted products, we observed that treatment with TWS119 preserves cells from acquisition of a fully effector phenotype by a decrease in effector cytokines, which has also been reported in mice and recently in humans [7], [9]. Interestingly, even with this decrease of cytokines and secreted factors, such a less differentiated phenotype has proven to be more effective to eradicate large tumors by ACT treatment [21], which has been partly repeated with naturally-arising T<sub>SCM</sub> (Gattinoni). Thus, activation of the Wnt pathway confers expression of a lymphoid homing receptor that is known to represent a key element for effective tumor response, but also expression of Bcl-2 and loss of active caspase-3, both favoring persistence and protection from apoptosis to human CD8<sup>+</sup> T cells from the periphery and infiltrating tumors.

In conclusion, our study is the first to explore the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human CD8<sup>+</sup> T cells from tumor infiltrate, and provides a basis to extend research towards antigen-specific models. These include T cells genetically-engineered to express T cell receptors or chimeric antigen receptors (CAR) which can be exploited with human CD8<sup>+</sup> T cells and could provide new insights on the impact of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation and extended persistence of these cells following ACT. As T<sub>SCM</sub> may also present different subtypes (based on CD133 expression and cytokine production, for example), more studies are needed to unravel the precise function and potential use of these cells.

## **Acknowledgments**

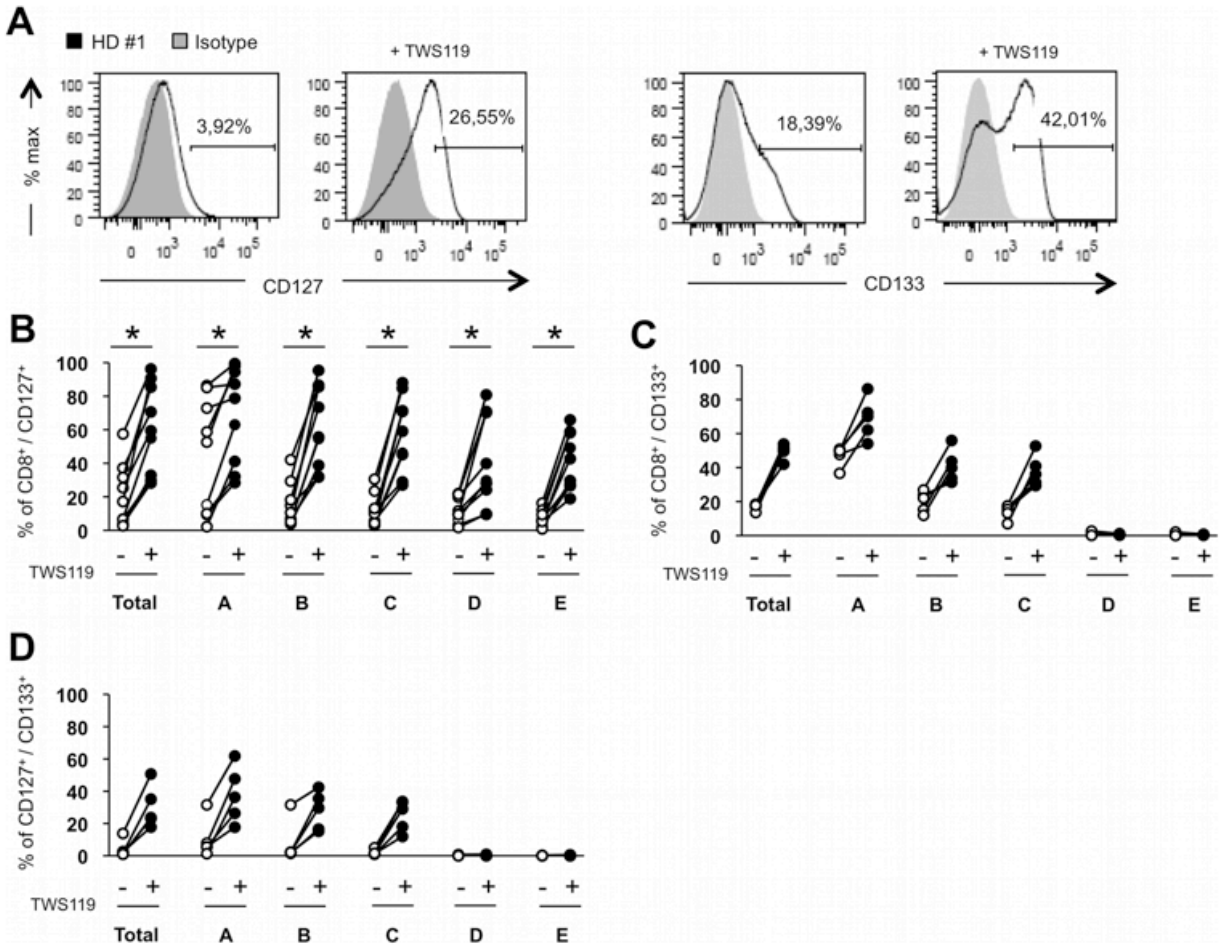
The authors want to thank Dominique Gauchat for her contribution in the elaboration and execution of the CBA as well as Sylvain Gimmig from BD Biosciences. Thanks to Dr. John Stagg and Laïla-Aïcha Hanafi for helpful discussions. We also thank Vicky Thiffault for her help in collecting lung cancer samples.

## Figures



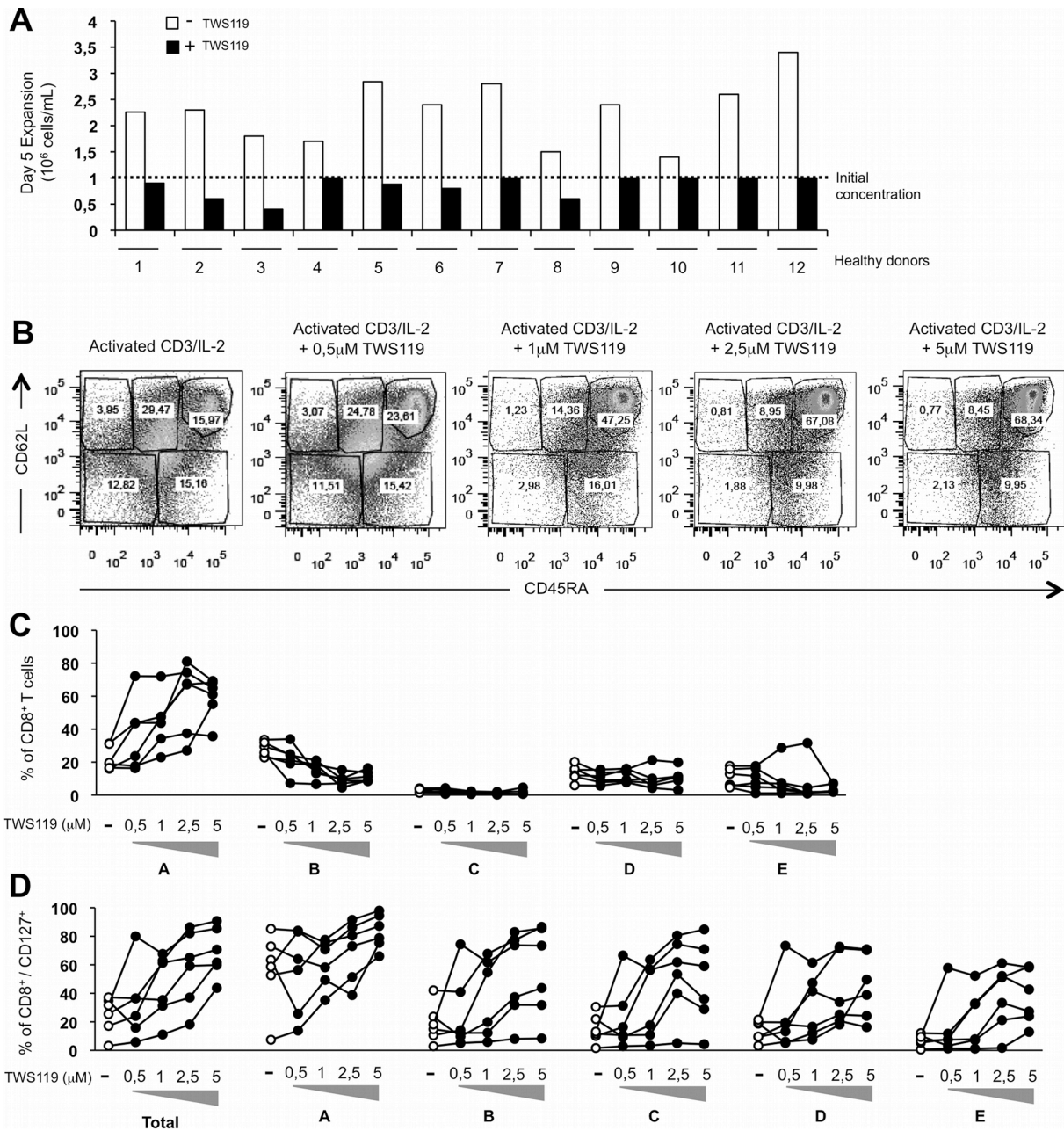
**Figure 1. Activation of human CD8<sup>+</sup> T cells via the Wnt pathway generates cells with a naive phenotype.**

CD8<sup>+</sup> T cells from peripheral blood of healthy donors were either untreated or polyclonally activated in the presence of TWS119 (Wnt pathway activator) prior to their analysis. (A) Evaluation of β-catenin protein expression by Western blot analysis from fresh CD8<sup>+</sup> T cells or CD8<sup>+</sup> T cells activated for 6 h in the presence of anti-CD3 and IL-2, with or without TWS119. β-actin protein level was used as a loading control. (B) Representative dot plot analysis of CD45RA and CD62L surface expression on CD8<sup>+</sup> T cells either fresh (left) or cultured 5 days with anti-CD3 and IL-2, with (middle) or without (right) TWS119. Subpopulations were defined according to isotype controls and population density. (C) Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells in each CD45RA/CD62L populations defined in panel B, for 11 healthy donors. \*  $P = 0.001$ ; \*\*  $P = 0.002$ .



**Figure 2. Activation of human CD8<sup>+</sup> T cells in the presence of TWS119 favors a young/memory phenotype.**

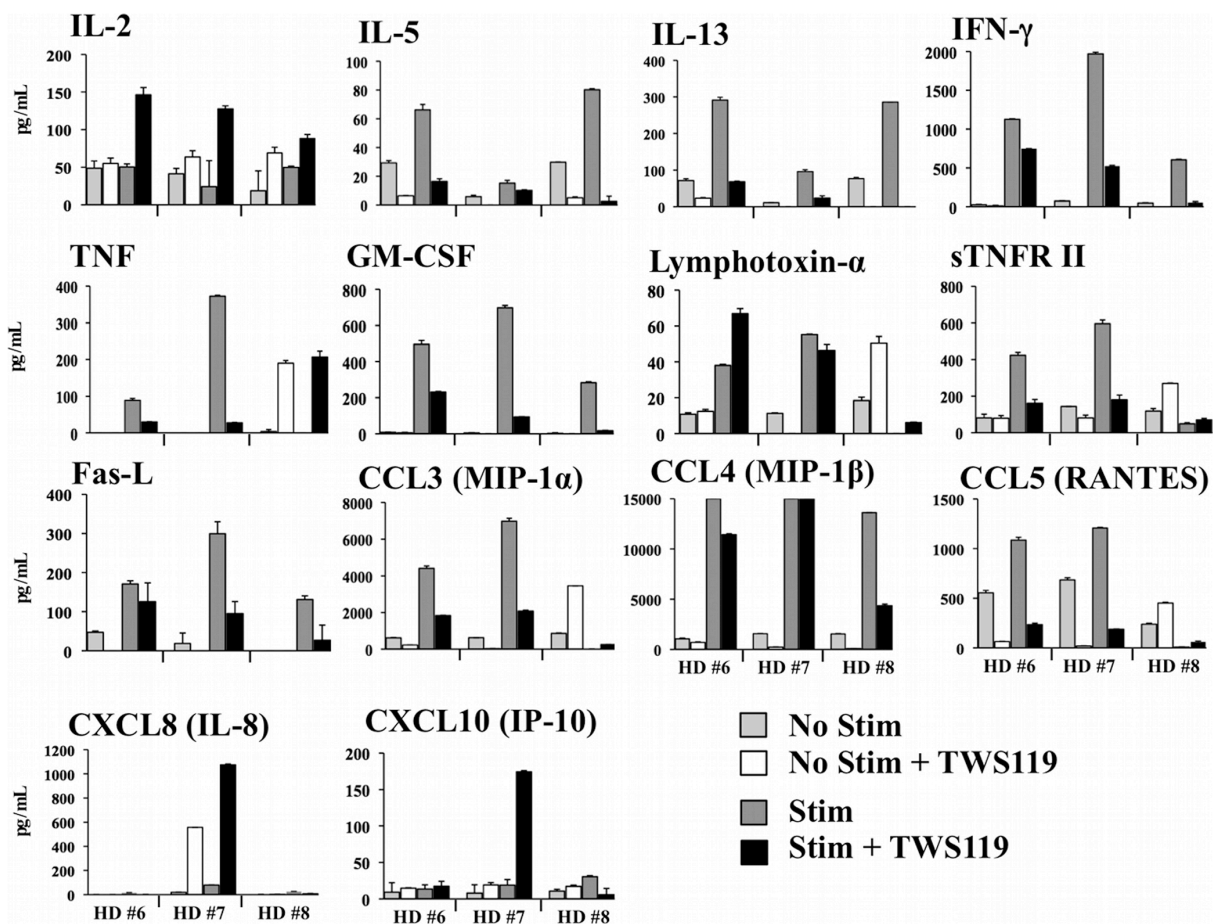
CD127 and CD133 expression in CD8<sup>+</sup> T cell sub-populations defined by expression of CD45RA and CD62L (see Figure 1A) following treatment with TWS119. (A) Representative histograms of total CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD127 or CD133 after a 5-day anti-CD3/IL-2 activation with or without TWS119. (B–C) Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells expressing, respectively, CD127 (B) and CD133 (C) in total CD8<sup>+</sup> T cell population (Total), and in each CD45RA/CD62L-defined population from Figure 1A, for 9 healthy donors in B and 5 in C. (D) Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells expressing both CD127 and CD133 markers in total CD8<sup>+</sup> T cell population (total) and in each CD45RA/CD62L-defined population from Figure 1A for 5 healthy donors. \*  $P < 0.004$ .



**Figure 3. A minimal concentration of 2.5 μM of TWS119 is required to generate T cells with a young/memory phenotype.**

Expression of CD45RA and CD62L on CD8<sup>+</sup> T cells from peripheral blood of healthy donors after activation of the Wnt pathway with TWS119 dose-response (0.5 to 5 μM). (A) Expansion of viable CD8<sup>+</sup> T cells activated with anti-CD3/IL-2 after five days of culture with or without 5 μM TWS119, illustrated by final cell concentration. Initial cell concentration was

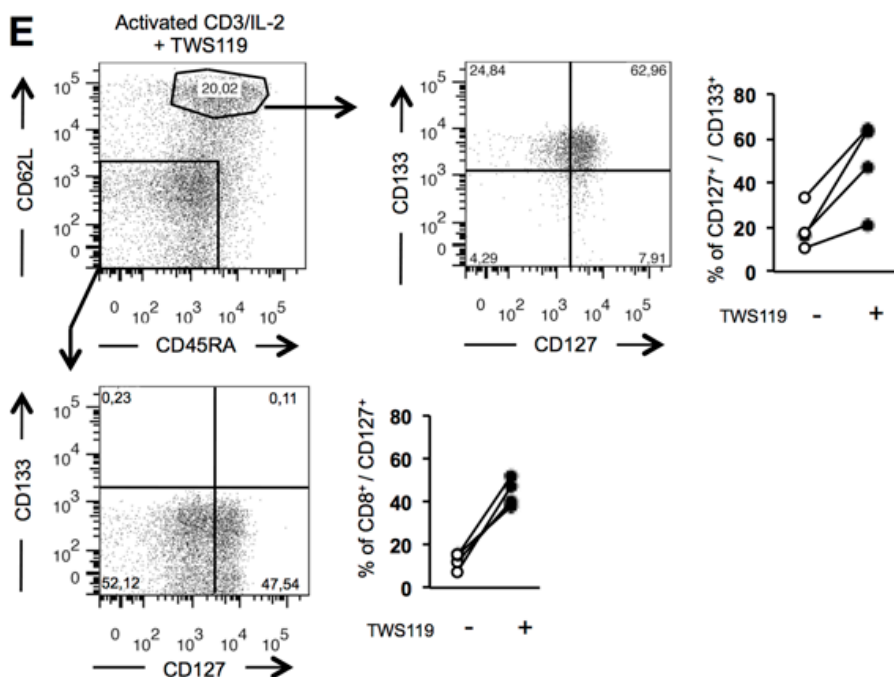
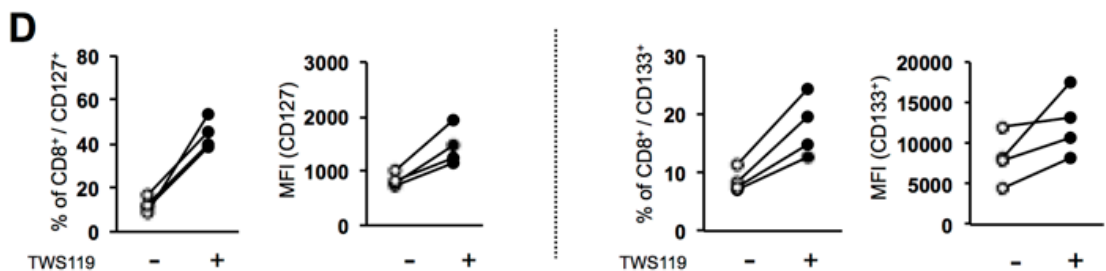
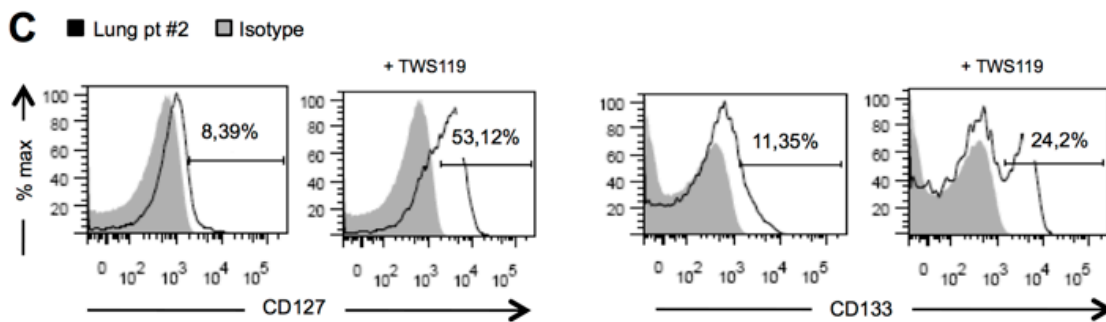
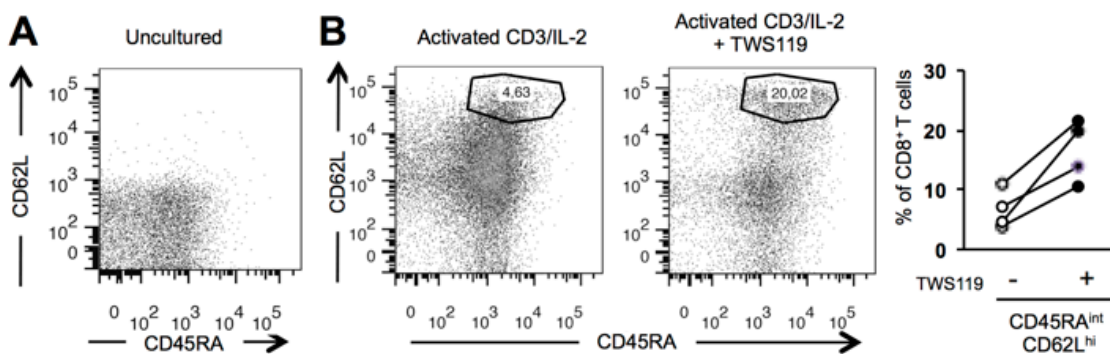
$1 \times 10^6$  cell/mL. (B) Representative dot plot analysis for surface expression of CD45RA and CD62L on CD8<sup>+</sup> T cells activated with anti-CD3/IL-2 with or without increasing concentrations of TWS119. (C) Percentage of total CD8<sup>+</sup> T cells in each CD45RA/CD62L population for 6 healthy donors. (D) Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD127 in total CD8<sup>+</sup> T cell population in a TWS119 dose-response, in each population defined by expression of CD45RA and CD62L in Figure 1A (for 6 donors).



**Figure 4. Activation of the Wnt pathway in human CD8<sup>+</sup> T cells modulates secretion of effector cytokines/chemokines and secreted factors.**

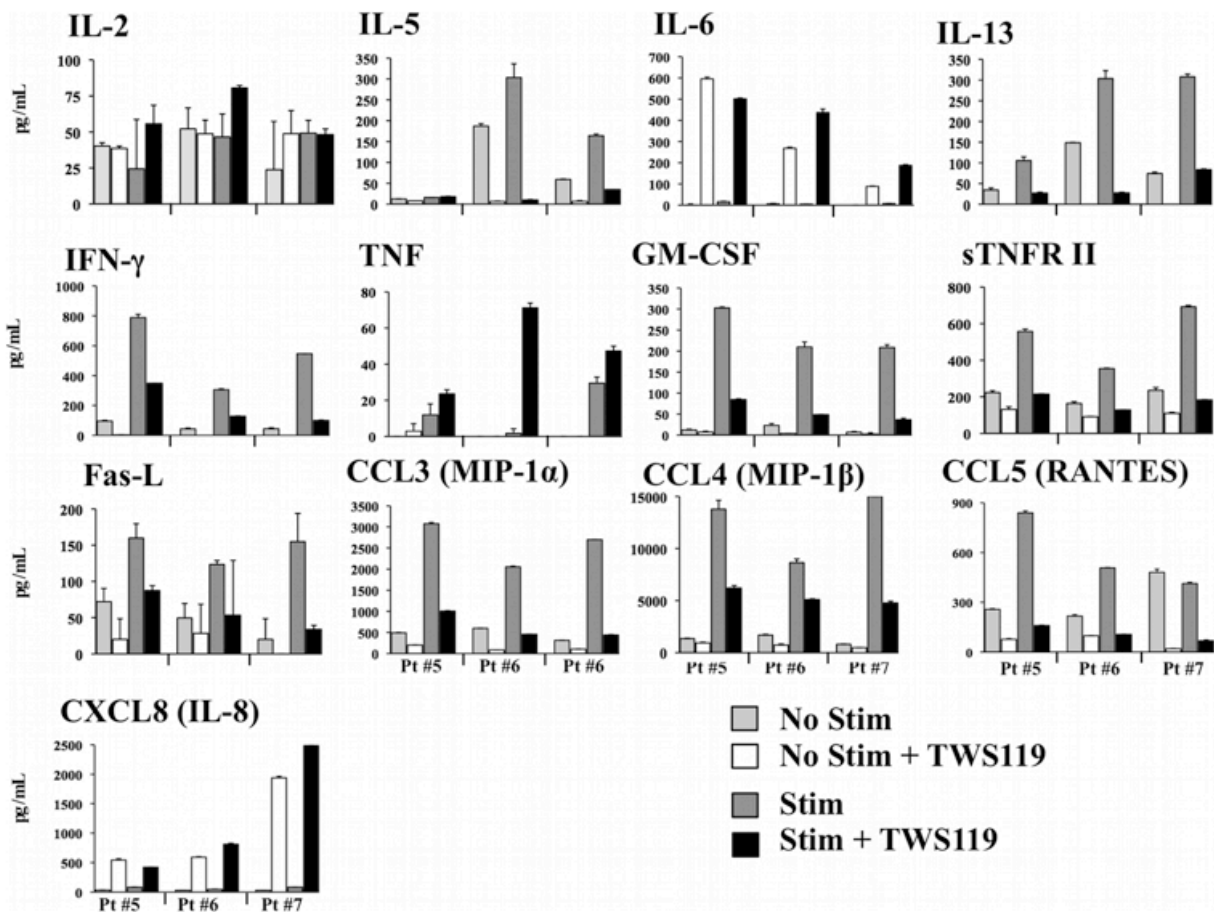
Cytokine secretion profile of total CD8<sup>+</sup> T cells from peripheral blood of healthy donors following the Wnt pathway activation with TWS119. Cytokine secretion was measured by CBA with a panel of 27 cytokines in supernatant of total CD8<sup>+</sup> T cells cultured with anti-CD3/IL-2 and TWS119 and reactivated with anti-CD3/anti-CD28 and TWS119 (data from 3 healthy donors). Only cytokines considered positive for secretion (>50 pg/mL and double or higher the “No Stimulation” value) are presented (negative for IL-1 $\beta$ , -4, -6, -7, -9, -10, -12p70, -17a, -21, CD40L, TNF-RI, CXCL9 (MIG) and VEGF).





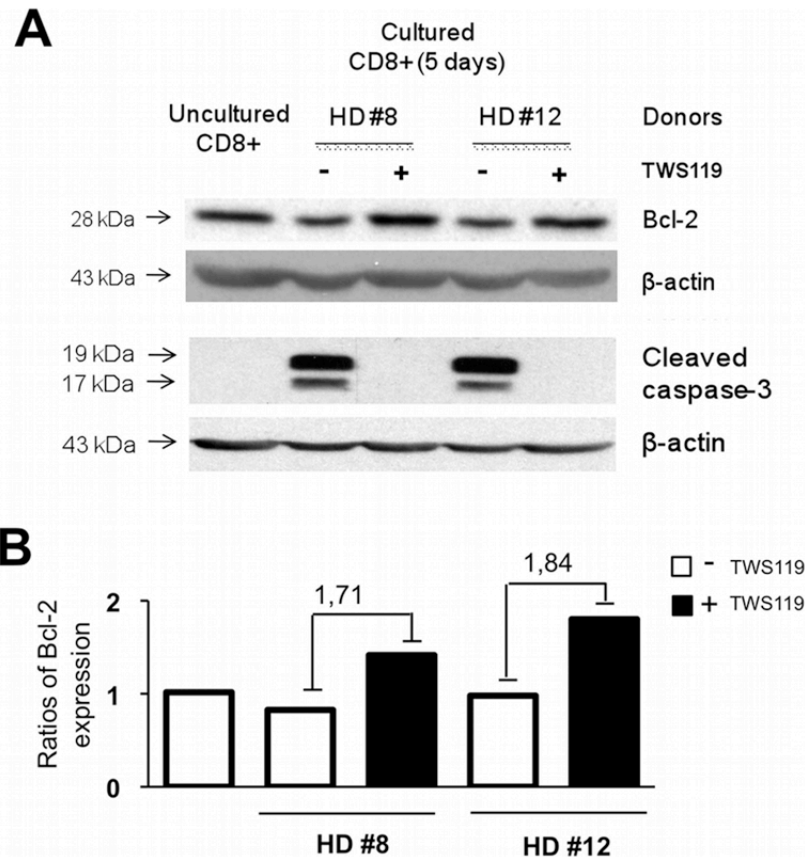
**Figure 5. Human CD8<sup>+</sup> TIL activated via the Wnt pathway acquire a young/memory phenotype.**

CD8<sup>+</sup> T cells isolated from lung TIL were cultured with TWS119 and expression of CD45RA, CD62L, CD127 and CD133 was determined by flow cytometry. (A) Representative flow cytometry analysis for CD45RA and CD62L expression on CD8<sup>+</sup> TIL freshly-isolated from lung cancer tumors (representative of 4 tumors). (B) Representative analysis of CD45RA/CD62L expression on CD8<sup>+</sup> TIL following 5 days of anti-CD3/IL-2 activation, with or without TWS119. Compilation graph from 4 patients for the CD45RA<sup>int</sup>/CD62L<sup>+</sup> defined population (right panel). (C) Representative histogram analysis of CD127 (left) or CD133 (right) expression in total CD8<sup>+</sup> TIL following 5 days of anti-CD3/IL-2, with or without TWS119. (D) Compilation graphs for CD127 and CD133 expression (percentage and MFI as indicated) on total activated CD8<sup>+</sup> TIL. (E) Characterization of CD127 and CD133 expression by different CD45RA/CD62L-defined CD8<sup>+</sup> TIL, following treatment with TWS119. Specifically, expression of CD127 and CD133 on CD45RA<sup>int</sup>/CD62L<sup>+</sup> and CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TIL populations is shown, after culture with TWS119.



**Figure 6. Activation of the Wnt pathway in human CD8<sup>+</sup> TIL from lung cancer tumors with TWS119 diminishes secretion of effector cytokines.**

Cytokine secretion profile of CD8<sup>+</sup> TIL from lung cancer tumors after activation of the Wnt pathway with TWS119. Cytokine secretion was measured by CBA with a panel of 27 cytokines in supernatant of total CD8<sup>+</sup> TIL cultured with anti-CD3/IL-2 and TWS119 and reactivated overnight with anti-CD3/anti-CD28 and TWS119 (for 3 lung cancer tumors). Only cytokines considered positive for secretion (>50 pg/mL and double or higher the “No Stimulation” value) are presented (negative for IL-1 $\beta$ , -4, -7, -9, -10, -12p70, -17a, -21, CD40L, LT- $\alpha$ , TNF-RI, CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) and VEGF).



**Figure 7. Treatment of human CD8<sup>+</sup> T cells with TWS119 protects against apoptosis.**

Molecular analysis of anti- and pro-apoptosis actors in CD8<sup>+</sup> T cells following activation of the canonical Wnt pathway. (A) Densitometric profile of Western blot analysis of the Bcl-2 protein. Data are presented as ratios of Bcl-2 protein expression (normalized with β-actin) and fold changes between CD8<sup>+</sup> T cells cultured with and without TWS119 for 2 healthy donors (representative of 5). (B) Western blot analysis of the cleaved form of caspase-3 (2 fragments) in total CD8<sup>+</sup> T cells following 5 day anti-CD3/IL-2 activation with or without TWS119 for 2 healthy donors (representative of 5).

## References

1. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, et al. (2005) Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *N Engl J Med* 23: 2346–2357.
2. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, et al. (2008) Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26: 5233– 5239.
3. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, et al. (2008) Adoptive transfer of effector CD8<sup>+</sup> T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* 118: 294–305.
4. Hinrichs CS, Borman ZA, Cassard L, Gattinoni L, Spolski R, et al. (2009) Adoptively transferred effector cells derived from naïve rather than central memory CD8 T cells mediate superior antitumor immunity. *Blood* 106.
5. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, et al. (2010) Human effector CD8<sup>+</sup> T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*.
6. Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG (2005) Host-reactive CD8<sup>+</sup> memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nat Med* 11: 1299–1305.
7. Gattinoni L, Zhong X-S, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, et al. (2009) Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8<sup>+</sup> memory stem cells. *Nat Med* 15: 808–814.
8. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, et al. (2011) A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 17: 1290–1297.
9. Muralidharan S, Hanley PJ, Liu E, Chakraborty R, Bollard C, et al. (2011) Activation of Wnt signaling arrests effector differentiation in human peripheral and cord blood-derived T lymphocytes. *J Immunol* 187: 5221–5232.
10. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, et al. (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 409– 414.
11. Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W (1997) A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood* 89: 3624–3635.

12. Staal FJ, Meeldijk J, Moerer P, Jay P, van de Weerd BC, et al. (2001) Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur J Immunol* 31: 285–293.
13. Xu Y, Banerjee D, Huelsken J, Birchmeier W, Sen JM (2003) Deletion of beta- catenin impairs T cell development. *Nat Immunol* 4: 1177–1182.
14. Jeannot G, Boudousquie C, Gardiol N, Kang J, Huelsken J, et al. (2010) Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9777–9782.
15. Zhao DM, Yu S, Zhou X, Haring JS, Held W, et al. (2010) Constitutive activation of Wnt signaling favors generation of memory CD8 T cells. *J Immunol* 184: 1191–1199.
16. Grange C, Letourneau J, Forget MA, Godin-Ethier J, Martin J, et al. (2011) Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation. *J Immunol Meth* 372: 119–126.
17. Yannelli JR, Hyatt C, McConnell S, Hines K, Jacknin L, et al. (1996) Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int J Can* 65: 413–421.
18. Pelletier S, Tanguay S, Lee S, Gunaratnam L, Arbour N, et al. (2009) TGF- alpha as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Can Immunol Immunother* 58: 1207–1218.
19. Peant B, Diallo JS, Dufour F, Le Page C, Delvoye N, et al. (2009) Over- expression of I kappa B-kinase-epsilon (IKKepsilon/IKKi) induces secretion of inflammatory cytokines in prostate cancer cell lines. *69*: 706–718.1934.
20. Ding S, Wu TY, Brinker A, Peters EC, Hur W, et al. (2003) Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7632–7637.
21. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, et al. (2005) Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest* 115: 1616–1626.
22. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, et al. (2003) Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4: 1191–1198.

24. Tarnok A, Ulrich H, Bocsi J (2010) Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry* 77: 6–10.
25. Barcelos LS, Duplaa C, Krankel N, Graiani G, Invernici G, et al. (2009) Human CD133+ progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling. *Circ Res* 104: 1095–1102.
26. Godin-Ethier J, Pelletier S, Hanafi L-A, Gannon PO, Forget M-A, et al. (2009) Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. *J Immunol* 183: 7752–7760.
27. Zeng FY, Dong H, Cui J, Liu L, Chen T (2010) Glycogen synthase kinase 3 regulates PAX3-FKHR-mediated cell proliferation in human alveolar rhabdomyosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Comm* 391: 1049–1055.
28. Lovatt M, Bijlmakers MJ (2010) Stabilisation of beta-catenin downstream of T cell receptor signalling. *Plos ONE* 5. Ohteki T, Parsons M, Zakarian A, Jones RG, Nguyen LT, et al. (2000) Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3. *J Exp Med* 192: 99–104.
29. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G (2009) Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 9: 324–337. Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A (2009) Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* 156: 885–898.
30. Castilho RM, Squarize CH, Chodosh LA, Williams BO, Gutkind JS (2009) mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell* 5: 279–289.
31. Driessens G, Zheng Y, Locke F, Cannon JL, Gounari F, et al. (2011) Beta-catenin inhibits T cell activation by selective interference with linker for activation of T cells-phospholipase C-gamma1 phosphorylation. *J Immunol* 186: 784–790.
32. Driessens G, Zheng Y, Gajewski TF (2010) Beta-catenin does not regulate memory T cell phenotype. *Nat Med* 16: 513–514; author reply 514–515.
33. Bachmann MF, Wolint P, Schwarz K, Jager P, Oxenius A (2005) Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J Immunol* 175: 4686–4696.

34. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, et al. (2007) Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27: 281–295.
35. Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, et al. (2004) Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 114: 182–195.
36. Denton AE, Russ BE, Doherty PC, Rao S, Turner SJ (2011) Differentiation- dependent functional and epigenetic landscapes for cytokine genes in virus- specific CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
37. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275: 1930– 1934.



## **Annexe III : Manuscrit**

**Endogenously expressed matrix protein M1 and nucleoprotein of influenza A are efficiently presented by class I and class II major histocompatibility complexes**

J Gen Virol. 2011 May;92(Pt 5):1162-71.

Jean-Daniel Doucet, Marie-Andrée Forget, Cécile Grange, Ronan Nicolas Rouxel<sup>2</sup>  
Nathalie Arbour, Veronika von Messling and Réjean Lapointe

### **Contribution ans cet article:**

*Dans cet article, j'ai apporté une contribution technique en réalisant les expériences préliminaires de ce projet qui ont permis de réaliser la figure 2. J'ai également apporté des critiques lors de l'écriture du manuscrit.*

## **Abstract**

Current influenza vaccines containing primarily hypervariable haemagglutinin and neuraminidase proteins must be prepared against frequent new antigenic variants. Therefore, there is an ongoing effort to develop influenza vaccines that also elicit strong and sustained cytotoxic responses against highly conserved determinants such as the matrix (M1) protein and nucleoprotein (NP). However, their antigenic presentation properties in humans are less defined. Accordingly, we analysed MHC class I and class II presentation of endogenously processed M1 and NP in human antigen presenting cells and observed expansion of both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>-specific effector T lymphocytes secreting gamma interferon and tumour necrosis factor. Further enhancement of basal MHC-II antigenic presentation did not improve CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-cell quality based on cytokine production upon challenge, suggesting that endogenous M1 and NP MHC-II presentation is sufficient. These new insights about T-lymphocyte expansion following endogenous M1 and NP MHC-I and -II presentation will be important to design complementary heterosubtypic vaccination strategies.

## Introduction

Current trivalent inactivated influenza vaccines (TIV) mainly induce a humoral response against hypervariable haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) surface antigens. Hence, production of new vaccines is required for every new influenza strain. Considering the ongoing threat of an influenza pandemic (WHO, 2009), vaccines targeting better conserved antigens are required. The influenza A matrix protein (M1) and nucleoprotein (NP) share more than 90% amino acid sequence identity even between distant influenza A subtypes (Heiny et al., 2007; and see Supplementary Table S1, available in JGV Online). Moreover, many human M1 and NP T-cell epitopes are essential for the virus' fitness (Berkhoff et al., 2006) and are thus well conserved (Bui et al., 2007; Lee et al., 2008). In contrast, HA and NA vary in up to 40% of their amino acid sequence. These differences are mainly seen in the extracellular globular head of the HA glycoprotein, which contains the receptor-binding site (Schweiger et al., 2002) whose inhibition is critical to prevent cell entry of the virus. Hence, HA glycoprotein is less likely to induce heterosubtypic cross-reactive immunity.

Viral proteins must be processed by infected cells or antigen presenting cells (APCs) to elicit a cellular immune response. Although such a response does not confer sterile immunity to influenza, it has been shown to mediate influenza virus clearance in animal models (Thomas et al., 2006) and in humans (McMichael et al., 1983). In animal models, a cellular immune response has long been associated with heterosubtypic protection against various influenza A strains (Furuya et al., 2010; Taylor & Askonas, 1986), including H5N1 (Epstein et al., 2002; Price et al., 2009; Zhirnov et al., 2007) and the 2009 pandemic H1N1 (Skountzou et al., 2010). It has also been established that M1 and NP (Kreijtz et al., 2008; Lee et al., 2008) are the main targets of the human immune cellular response against influenza, while HA and NA are the main protective targets for the humoral immune response. Hence, recent reports strongly suggest that M1 and NP could be very relevant targets for an influenza pan-specific vaccine.

A wide range of conserved MHCs of class I and class II influenza A NP- and M1-specific epitopes has been characterized (Jameson et al., 1999; Kreijtz et al., 2008; Lee et al., 2008). However, little is known about how influenza-protein processing in human APCs

stimulates expansion of T lymphocytes, particularly when these proteins are endogenously expressed, which would most probably be the case in T-cell-stimulating vaccines. Most studies on epitope identification with influenza-specific human T cells have exploited peptide libraries covering the influenza genome (Kreijtz et al., 2008; Lee et al., 2008), exogenously loaded proteins (Gschoesser et al., 2002) or influenza-infected cells (Gschoesser et al., 2002; Jameson et al., 1999; Kreijtz et al., 2008). In the latter two cases, some of the processed proteins could originate from an exogenous source potentially involving the endosomal pathway, while use of peptide libraries excludes endogenous processing pathways. In contrast, vaccines inducing M1- and NP-specific T-cell expansion, such as the live-attenuated virus vaccines (LAIV) most likely involve endogenous expression of these proteins. Endogenously expressed M1 is known to be presented by MHC-I and cross-presented by MHC-II in human APCs (Jaraquemada et al., 1990; Nuchtern et al., 1990). However, the magnitude and importance of MHC-II cross-presentation of endogenous M1 is unclear (Schmid et al., 2007), and no information is available regarding NP MHC-II cross-presentation. It is also unclear whether MHC-II cross-presentation can stimulate a robust *in vitro* expansion of specific T lymphocytes.

Here, we sought to characterize the MHC-I and -II presentation of endogenous influenza M1 and NP antigens in a T-cell-inducing vaccine-like context for the first time. We performed *in vitro* T-cell sensitization assays, by stimulating normal (healthy) donor (ND) peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with autologous APCs expressing endogenous M1 or NP antigens from a DNA plasmid and by characterizing the ensuing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte response. Considering the capacity of endogenously expressed M1 to be presented by MHC-II, we questioned whether NP shared similar properties. Finally, we investigated whether the level of MHC-II cross-presentation was sufficient for M1 and NP CD4<sup>+</sup> T-cell expansion, which plays a key role in cellular immune responses.

## Results

### Efficient presentation of MHC-I and -II epitopes derived from M1 and NP to human CD8+ and CD4+ T lymphocytes

Initially, we evaluated whether endogenous wild-type (WT) influenza M1 and NP proteins are efficiently presented by human MHC-I and -II. We electroporated CD40-activated B lymphocytes (CD40-B cells) with M1- and NP-encoding plasmids (Fig. 1a) and co-cultured them with previously generated autologous M1- or NP-specific CD8+ or CD4+ T-cell clones. CD40-B cells are valuable model APCs because they can be expanded from a limited quantity of PBMCs, while possessing antigen-presenting characteristics comparable to dendritic cells (Lapointe et al., 2003; Schultze et al., 1997). In these cells, endogenously expressed M1 and NP proteins were both recognized by CD8+ (Fig. 1c, black bars) and by CD4+ T-cell clones (Fig. 1d, black bars). To our knowledge, this represents the first report of NP MHC-II cross-presentation. Observed M1 MHC-II cross-presentation is in agreement with previous work (Jaraquemada et al., 1990; Nuchtern et al., 1990).

We next questioned whether this MHC-II presentation to CD4+ T cells could be enhanced to favour a better cellular immune response. We fused the M1 and NP genes with previously characterized gp100 MHC-II mobilization sequences (Fig. 1b; referred to as gp-M1 and gp-NP). These sequences enhance the MHC-II presentation of endogenous proteins by targeting them to endosomal compartments without disrupting presentation of MHC-I epitopes (Lepage & Lapointe, 2006).

To compare M1 and NP expression levels with or without gp100 MHC-II enhancing sequences in human cells, their expression in human embryonic kidney (HEK)-293T cells was assessed by Western blotting (M1) and intracellular staining (NP). Both M1 (27.9 kDa) and gp-M1 (39.9 kDa) were produced at comparable levels (Fig. 1e). The faster-migrating band in the gp-M1 lane represents the gp-M1 fusion protein after gp100 signal peptide (SS) cleavage. The proportions of NP- and gp-NP-transfected cells were also similar for both proteins, as were their expression level as determined by the mean fluorescence intensity (MFI) determined by flow cytometry (Fig. 1f). Thus, both WT (M1 or NP) and MHC-II-enhanced (gp-M1 or gp-NP) proteins were produced at similar levels. Accordingly, M1 and gp-M1 were

equally recognized by a CD8<sup>+</sup> T-cell clone specific to the well-characterized and conserved HLA-A2 restricted M158–66 epitope (Bednarek et al., 1991; Touvrey et al., 2009) (data not shown). Overall, gp100 MHC-II mobilization sequences did not seem to affect M1 or NP expression levels.

Consistent with the previously reported enhancement of MHC-II presentation associated with the gp100 sequences (Lepage & Lapointe, 2006), gp-M1 and gp-NP resulted in higher gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) secretion by CD4<sup>+</sup> T-cell clones compared with their WT counterparts (Fig. 1d, grey bars), while MHC-I presentation to CD8<sup>+</sup> T cells was slightly down-modulated (Fig. 1c, grey bars). These results are also in line with M1 MHC-II enhanced presentation with autophagosome-associated protein Atg8/LC3 sequences (Schmid et al., 2007). It was unclear, however, if enhanced MHC-II presentation improved CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell expansion.

### **Expansion of human T lymphocytes by *in vitro* T-cell sensitization with endogenously expressed M1 and NP**

To evaluate if enhanced MHC-II presentation improved CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell expansion, we next stimulated PBMCs with autologous CD40-B cells electroporated with M1, gp-M1, NP or gp-NP plasmids. Bulk T-cell cultures were restimulated according to the same procedure on day 7. T cells were tested for specificity to their relevant antigens on day 21 of the expansion protocol, 14 days after antigen stimulation to obtain sufficient cell counts.

Recognition assays from T-cell expansions were performed with three representative HLA-A2<sup>+</sup> NDs. All donors developed M1- and NP-specific T-cell lines when stimulated with M1 and NP, with or without enhancement of MHC-II presentation, as determined by IFN- $\gamma$  secretion (Fig. 2a, b). Addition of antibodies blocking MHC-I and -II presentation of APCs revealed that most of M1 and NP T-cell lines were composed of CD8<sup>+</sup> T cells as IFN- $\gamma$  secretion was inhibited by MHC-I-specific antibodies (black arrows). A similar IFN- $\gamma$  response by CD8<sup>+</sup> T cells was observed in three additional NDs (Supplementary Fig. S1a, c, d). Among these T-cell lines, at least one responded to the defined M158–66 epitope (Supplementary Fig. S1d), which is consistent with reports of the M158–66 epitope being an

important part of a relatively broad influenza T-cell epitope response in HLA-A2+ NDs (Boon et al., 2002).

Furthermore, M1 and NP stimulations of bulk T cells resulted in the generation of CD4+ T cells secreting significant amounts of IFN- $\gamma$ , since MHC-II blocking antibodies interfered with IFN- $\gamma$  secretion by M1- (ND#2 and #3), NP- (ND#3) and gp-NP- (ND#2) grown T-cell lines (Fig. 2a, b, white arrows). Similar results were also obtained with gp-M1 expanded T-cell lines with two other NDs (Supplementary Fig. S1b, c). Moreover, a single-cell line may contain a heterogeneous population of both CD4+ and CD8+ T lymphocytes thereby explaining the effect of both MHC-I and -II-blocking antibodies on certain cell lines (M1-grown, ND#2 and #3). However, expansion of CD4+ T cells was independent of the presence of the MHC-II enhancing sequences. The efficacy of the MHC-blocking antibodies was controlled by the blockade or strong inhibition of IFN- $\gamma$  secretion by previously isolated CD8+ or CD4+ T-cell clones (Fig. 2c, d).

Together, these results indicate that both CD8+ and CD4+ T cells can be simultaneously expanded by exposure to endogenous M1 and NP in an in vitro T-cell sensitization assay, with or without enhancement of MHC-II presentation, based on IFN- $\gamma$  secretion from the bulk T-cell population. However, in addition to IFN- $\gamma$ , other Th1 cytokines are required for optimal antiviral activity. Indeed, multi-cytokine secretion is intimately linked to robust immune cellular responses.

### **Effector cytokine secretion of M1- and NP-specific CD8+ and CD4+ T cells**

Accordingly, we investigated the quality of M1 and NP CD8+ T cells generated by in vitro T-cell sensitization at the single-cell level. More specifically, we evaluated whether the intrinsic endogenous MHC-II presentation of M1 and NP antigens was sufficient for the generation of CD4+ T-cell-mediated help that could improve the quality of expanded CD8+ T cells. We, therefore, analysed multi-cytokine expression [IFN- $\gamma$ , tumour necrosis factor (TNF) and interleukin (IL)-2] by M1- and NP-specific T cells after stimulation with their cognate antigen using intracellular cytokine staining (ICS). An example of the gating strategy is shown in Supplementary Fig. S2. While no IL-2 expression was detected in any of the CD8+ T-cell lines tested (data not shown), 0.5–4% of T cells from each line produced both TNF and IFN- $\gamma$

(Fig. 3a–c). Up to 6% of T cells were single IFN- $\gamma$  producers, and up to 3% produced TNF only (Fig. 3a–c). Furthermore, CD8<sup>+</sup> T-cell clones expanded with either gp-M1- or NP-expressing APCs presented the degranulation marker CD107a on their cellular surface after antigen-specific stimulation (Supplementary Fig. S3a). Macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1 $\beta$ ), an important chemokine for the recruitment of memory T cells and other immune cell types, was also detected in most M1- and NP-specific T-cell lines (Supplementary Fig. S3b).

Consistent with IFN- $\gamma$  quantification (Fig. 2), MHC-II-enhanced presentation of M1 and NP did not result in increased CD4<sup>+</sup> T-cell responders (Fig. 4). Comparable proportions of TNF<sup>+</sup> or TNF<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were obtained in M1- and NP-specific T-cell lines expanded with either MHC-II-enhanced or WT sequences. In contrast to CD8<sup>+</sup> T cells, low IL-2 levels were occasionally detected in CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 4b).

Overall, our results indicate that, in the context of *in vitro* T-cell sensitization, the intrinsic MHC-II presentation of endogenously expressed M1 and NP antigens is sufficient for Th1 cytokine secretion of specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. The secretion of Th1 cytokines further suggests an effector phenotype of the expanded M1- and NP-specific T lymphocytes.

### **Phenotype of M1- and NP-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells**

To pursue phenotypic characterization of IFN- $\gamma$ -secreting M1- and NP-specific T cells, their surface marker profiles were analysed. Most cells lacked the naive marker CD45RA, the secondary lymphoid tissue ‘homing’ receptor CD62L (Fig. 5), and the IL-7 receptor (CD127) (Supplementary Fig. S4), consistent with an effector T-cell phenotype. Again, there were no major differences between the phenotype of CD8<sup>+</sup> T cells from either MHC-II-enhanced or WT M1- and NP-grown T-cell lines (Fig. 5a), and a similar phenotype was observed in CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 5b).



## Discussion

A robust cellular immune response against conserved influenza M1 and NP could provide heterosubtypic immunity to influenza. Current TIVs do not induce a good cellular immune response. However, available modified LAIV (Mueller et al., 2010) or DNA vaccines in development (Kim & Jacob, 2009; Moss, 2009) are expected to trigger strong humoral and cellular immune responses. These influenza vaccines will most likely involve endogenous expression of antigens in APCs. Hence, this study focused on the characterization of MHC-I and -II presentation of endogenously expressed M1 and NP conserved influenza proteins by model APCs which expanded both CD8<sup>+</sup>- and CD4<sup>+</sup>-specific T lymphocytes from human PBMCs in *in vitro* T-cell sensitization assays. Furthermore, although MHC-II presentation was increased by the addition of gp100 MHC-II mobilization sequences, the quality of expanded M1- and NP-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells was comparable between MHC-II-enhanced or WT proteins expressed by APCs.

In line with previous reports that identified a variety of MHC-I and -II T-cell epitopes in M1 and NP recognized by most individuals' PBMCs (Gschoesser et al., 2002; Jameson et al., 1999; Krejtz et al., 2008; Lee et al., 2008), we expanded both M1- and NP-specific T lymphocytes from PBMCs of different HLA-A2<sup>+</sup> NDs. We have also identified some MHC epitopes recognized by these T cells (Doucet et al., 2010). However, many of the previous studies on influenza antigen presentation have focused on clonal T-cell populations that may have been altered during isolation. In contrast, we speculate that T-cell lines expanded in the current study more closely mimic *in vivo* polyclonal expansion. Accordingly, we obtained around 5–6% of specific T lymphocytes, which is consistent with the proportion of antigen-specific T cells expanded *in vivo*.

Furthermore, both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> M1- and NP-specific T cells were expanded. Classically, the MHC-II presentation of endogenously processed proteins to CD4<sup>+</sup> T cells is considered limited and restricted to exogenous proteins (Rush et al., 2002; Van den Bosch et al., 2006; Voo et al., 2002). MHC-I and -II influenza antigenic cross-presentation has, however, been reported. Soluble NP can be cross-presented by MHC-I in PBMCs (Gschoesser et al., 2002), whereas endogenous WT M1 can be cross-presented by MHC-II (Jaraquemada et al., 1990; Nuchtern et al., 1990). Thus, we report similar NP MHC-II antigenic cross-

presentation for the first time. It is also possible that M1 and NP were endocytosed from dying-electroporated APCs as a secondary classical MHC-II presentation mechanism. Nonetheless, there was MHC-II presentation to previously expanded CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 1f). In this case, the short period of time between APCs' electroporation and their co-culture with the CD4<sup>+</sup> T cells should not allow for dead APCs to be taken up by other APCs for classical MHC-II antigenic processing.

Hence, the precise mechanism of endogenous M1 and NP MHC-II cross-presentation is unclear. In the case of M1, it does not involve the classical endosomal secretory pathway (Jaraquemada et al., 1990; Nuchtern et al., 1990), the proteasome, or the transporter associated with antigen processing (TAP), but does instead depend on lysosomal proteases (Guéguen & Long, 1996). Considering the nuclear and cytoplasmic localization of these two proteins, autophagy, involved in influenza A replication, could be a plausible MHC-II cross-presentation mechanism (Schmid et al., 2007; Zhou et al., 2009). Accordingly, M1 MHC-II presentation was enhanced by autophagosomal targeting sequences (Schmid et al., 2007).

MHC-II antigenic cross-presentation of influenza antigens is of particular interest since the anti-influenza CD4<sup>+</sup> helper T cells are crucial for specific cellular immune responses (Janssen et al., 2003; Maecker et al., 1998; Swain et al., 2006). Our in vitro experimental setting did not allow long-term T-cell culture and therefore prevented the evaluation of the role of CD4<sup>+</sup> T cells in long-term CD8<sup>+</sup> memory T-cell expansion. Nevertheless, expanded CD4<sup>+</sup> T cells could directly participate in the peripheral anti-influenza immune response by secreting inflammatory cytokines/chemokines (Nakanishi et al., 2009; Swain et al., 2006). Indeed, mouse memory lung CD4<sup>+</sup> T cells have recently been shown to direct enhanced protection from influenza virus infection through effector functions such as IFN- $\gamma$  secretion (Teijaro et al., 2010).

Multifunctionality is a hallmark of an efficient antiviral T-cell response (Akondy et al., 2009; De Rosa et al., 2004; Miller et al., 2008; Seder et al., 2008) and is less characterized in human influenza-specific T cells (Lee et al., 2008; Touvrey et al., 2009), particularly after stimulation with multiple potential epitopes. In all donors, TNF- and/or IFN- $\gamma$ -secreting M1- and NP-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were detected, indicating the presence of Tc1 influenza-

specific effector CD8<sup>+</sup> T cells implicated in influenza virus clearance and protection (Baumgarth & Kelso, 1996; Deng et al., 2004; Hikono et al., 2006).

Furthermore, M1- and NP-specific T-cell lines secreted MIP-1 $\beta$ . C-C chemokine receptor 5 (CCR5), MIP-1 $\beta$ 's receptor, is transiently upregulated on CD8<sup>+</sup> memory T cells after influenza infection and has been shown to be crucial for virus control in mice (Kohlmeier et al., 2008). M1- and NP-specific T cells also degranulated upon antigen-specific stimulation, suggesting potential cytotoxic activity that is also critical in influenza virus clearance, although the presence of lytic enzymes was not assessed.

Altogether, our data suggest sufficient MHC-I and -II presentation of M1 and NP proteins for multifunctional effector T-cell expansion, at least upon short-term stimulation. Notably, NP-specific mouse CD8<sup>+</sup> T cells also present an effector phenotype 10 days following NP DNA vaccine immunization or influenza infection (Supplementary Fig. S5).

We also observed a comparable effector phenotype of M1- and NP-specific T cells expanded with or without MHC-II enhanced presentation, as determined by CD45RA and CD62L expression. However, in contrast to other studies carried out on influenza M158–66-specific T cells (Touvrey et al., 2009), we did not detect CD127, a marker present on both naive and memory T cells, on M1- and NP-specific effector (CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>) T cells. The lack of this marker may be explained by the early stage of effector T cells which did not yet re-express detectable levels of CD127 or by subtypes of memory T cell not expressing CD127 (Bachmann et al., 2005; Boettler et al., 2006; Touvrey et al., 2009). We also used IL-2 to expand T cells to sufficient numbers for our experiments, which could have favoured an effector phenotype.

Taken together, our results demonstrate that endogenously expressed influenza M1 and NP are sufficiently well presented by MHC-I and -II for in vitro short-term CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell activation. The mechanism by which influenza M1 and NP are cross-presented by MHC-II remains to be defined but could involve autophagy, among other alternative MHC cross-presenting pathways identified recently. Thus, the diversity of antigen presentation mechanisms appears to depend on the pathogen studied and could, therefore, contribute to reconfiguration and improvement of influenza vaccine strategies.

## **Methods**

### **PBMCs.**

PBMCs obtained from healthy individuals after informed consent were separated from heparinized donor blood as described previously (Pelletier et al., 2009). PBMCs were cryopreserved in 90% FBS (Wisent)/10% DMSO (Sigma), and stored in liquid nitrogen.

### **Generation of CD40-B cells.**

CD40-B cells were generated as described previously (Lapointe et al., 2003). Briefly, recombinant soluble CD40L (1000 ng ml<sup>-1</sup>; Immunex Corporation) and recombinant human IL-4 (250 U ml<sup>-1</sup>; Peprotech) were added to PBMCs on the first day which were then cultured in complete medium, consisting of Iscove's modified Dulbecco's complete medium (Invitrogen) supplemented with 7.5% human AB serum (heat-inactivated; Gemini Bio-products), 2 mM L-glutamine, 100 U penicillin ml<sup>-1</sup>, 100 g streptomycin ml<sup>-1</sup>, and 10 g gentamicin (Wisent) ml<sup>-1</sup>. Fresh complete medium containing 250 U IL-4 ml<sup>-1</sup> and 1000 ng CD40L ml<sup>-1</sup> was added on day 3. After the first round of proliferation (days 5–8), cells were either frozen for future use or restimulated every 2–3 days when the culture reached a density of 1.5–2×10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>, about 40–90% of proliferating cells being CD19<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> B lymphocytes.

### **Plasmids.**

NP and M1 from the influenza virus A/Puerto Rico/8/1934/H1N1 (PR8) strain [uniprot # P03466 (NP) and # P03485 (M1)], from which the first methionine was deleted, were cloned between the putative NH<sub>2</sub>-terminal signal sequence (first 23 residues) and the last 84 residues from gp100, which includes previously characterized MHC-II compartment mobilization sequences (Lepage & Lapointe, 2006). The resulting constructs, named gp-NP, gp-M1 and WT NP and M1 cDNA sequences, were optimized with GeneOptimizer from Geneart and cloned in pcDNA3.1(+) plasmid (Invitrogen). The plasmids were transformed into Escherichia coli one shot top 10 competent cells (Invitrogen) and prepared with Mega-Prep kit (Qiagen).

### **Cell lines.**

HEK-293T cells, obtained from ATCC, were cultured in RPMI 1640 (Wisent) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Wisent), 2 mmol L-glutamine L-1, 100 U penicillin/streptomycin ml<sup>-1</sup> and 10 µg gentamicin (R-10) ml<sup>-1</sup>. Cells were cryopreserved in 90% R-10/10% DMSO, and stored in liquid nitrogen.

### **Western blotting.**

HEK-293T cells were transfected with M1 or gp-M1 plasmids using Lipofectamine and Plus reagents (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, protein extracts from pelleted cells were prepared, quantified and resolved by 10% SDS-PAGE, as performed previously (Turcotte et al., 2007). An anti-M1 mouse mAb (1/200, clone GA2B; AbD Serotec) and a secondary peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (1/10000; Chemicon) were employed for Western blotting revelation.

### **Electroporation of APCs.**

APCs were electroporated with a MP-100 microporator (Digital-bio) following procedures according to the manufacturer. Briefly, CD40-B cells (1–2×10<sup>6</sup>) were sedimented for 15 min at 700 r.p.m. (100g) on a 164 mm diameter SO-1T rotor, resuspended in 200 µl of resuspension buffer (Digital-bio) and mixed with 3 µg 10<sup>-6</sup> cells of DNA. The cells were immediately electroporated with one pulse at 1700 V for 20 ms and resuspended at 1×10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup> of Iscove's modified Dulbecco's complete medium containing 10% FBS and 2 mM L-glutamine (all from Wisent), without antibiotics. GFP-electroporated CD40-B cells were used as controls for transgene expression in every experiment. GFP expression in CD40-B cells was around 30% at the initiation of the co-culture with PBMCs (data not shown).

### **Expansion of M1- or NP-specific peripheral T lymphocytes and cloning of antigen-specific bulk T-cell cultures.**

PBMCs were stimulated with autologous CD40-B cells electroporated with the M1, gp-M1, NP or gp-NP DNA plasmids in a 2:1 ratio. On day 7, bulk T cells were restimulated according to the same procedure, and 150–300 IU IL-2 (Feldan Bio) ml<sup>-1</sup> was added to the

cultures on the following day and every 2–3 days. T-cell specificity was assessed on day 21 by ELISA or by intracellular cytokine assay on the basis of cytokine secretion. T-cell lines or clones ( $5 \times 10^4$ ) were co-cultured with CD40-B cells ( $5 \times 10^4$ ) electroporated with DNA or pulsed with peptides. IFN- $\gamma$  secretion was measured by ELISA as described previously (Pelletier et al., 2009). In some recognition assays, CD40-B cells were pre-pulsed for 20 min at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> with 40–80  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of blocking antibodies specific for either MHC-I (clone W6/32) or MHC-II (clone IV A12).

M1- or NP-specific bulk T cells expanded as mentioned earlier were cloned by limiting dilution and cultured as described previously (Lapointe et al., 2003). T-cell clone phenotypes were analysed by flow cytometry, and their specificities were evaluated as before by co-culture with M1- or NP- electroporated CD40-B cells on the basis of their IFN- $\gamma$  secretion.

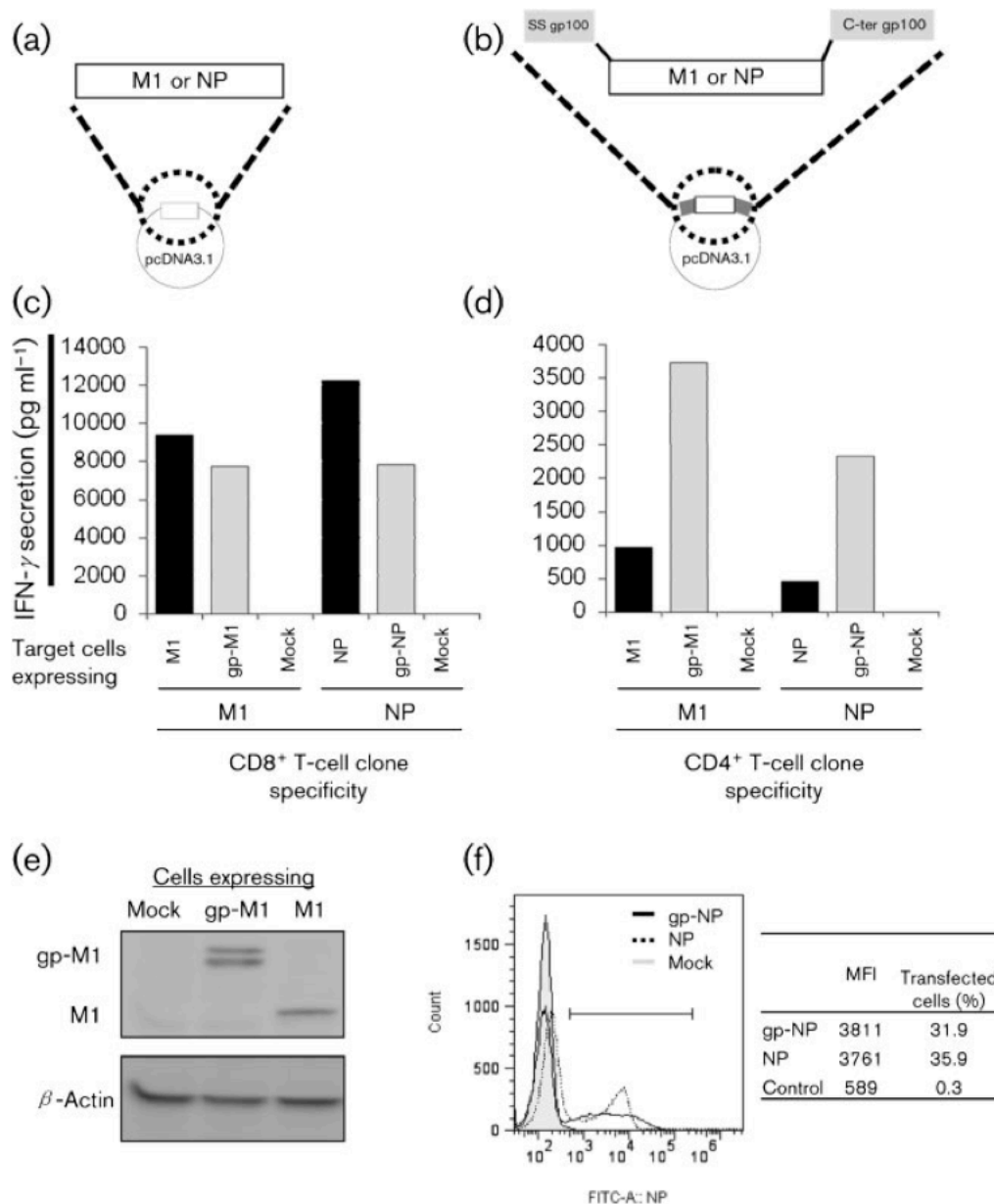
### **Recognition assays.**

IFN- $\gamma$  ELISAs were performed as before (Pelletier et al., 2009), while MIP-1 $\beta$  ELISAs were performed with the CCL4/MIP-1 $\beta$  DuoSet kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

For ICS, T-cell lines were co-cultured with autologous CD40-B cells electroporated with M1, gp-M1, NP or gp-NP DNA plasmids in a 2:1 ratio for 1 h and for an additional 6 h in the presence of brefeldin A (5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; Sigma). The cells were stained with Alexa-700, Pacific Blue and Allophycocyanin (APCy)-H7-conjugated antibodies specific to human CD3, CD4 and CD8, respectively (all from BD Biosciences). For T-cell phenotype analysis, the cells were also stained with APCy, PE and FITC-conjugated antibodies specific for human CD62L, CD127 and CD45RA or corresponding isotype controls (all from BD Biosciences). Dead cells were excluded by staining with the live/dead fixable dead cell stain kits (Invitrogen) when indicated. The cells were surface stained, fixed and permeabilized with FoxP3 staining buffer set (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Intracellular staining was performed with antibodies against IFN- $\gamma$  (eBioscience), TNF, IL-2 (the last two from BD Biosciences) or corresponding isotype controls. Flow cytometry data were acquired using the LSRII instrument (BD Bioscience), and analysed by FlowJo software (Tree Star) with a Boolean gating strategy.

For intracellular detection of NP, HEK-293T cells were transfected as before, with NP or gp-NP with a fluorescein-conjugated antibody against influenza A NP (cat #12-030; Argene).

## Figures

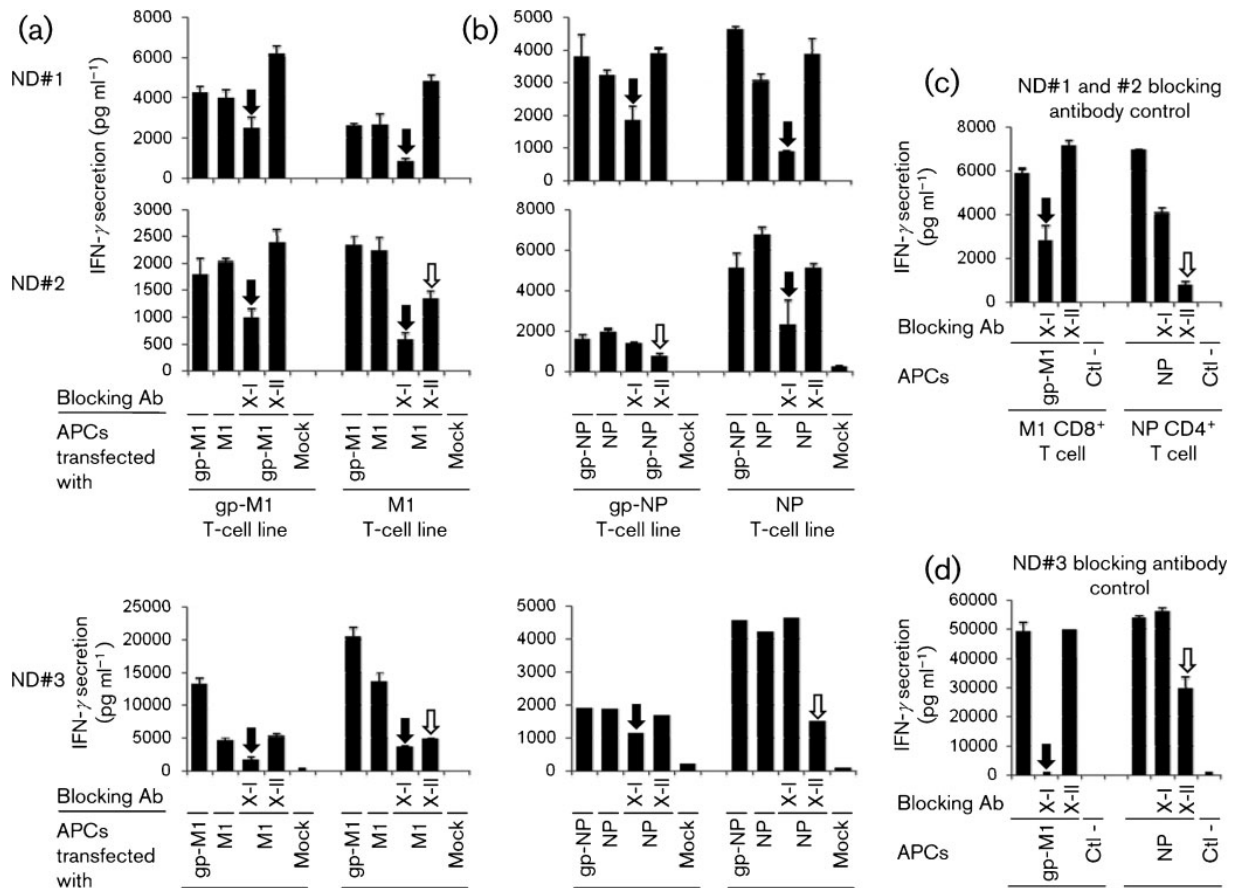


**Fig. 1. MHC-I and -II presentation of endogenously expressed influenza M1 and NP.**

Scheme of (a) WT M1 or NP and (b) M1 or NP cloned with gp100 MHC-II mobilization sequences in pcDNA3.1 plasmid. (c, d) CD40-B cells (APCs) were electroporated with plasmids encoding WT proteins (black bars), proteins cloned in fusion with the gp100 MHC-II mobilization sequences (grey bars) or an irrelevant mock (Dickkopf-

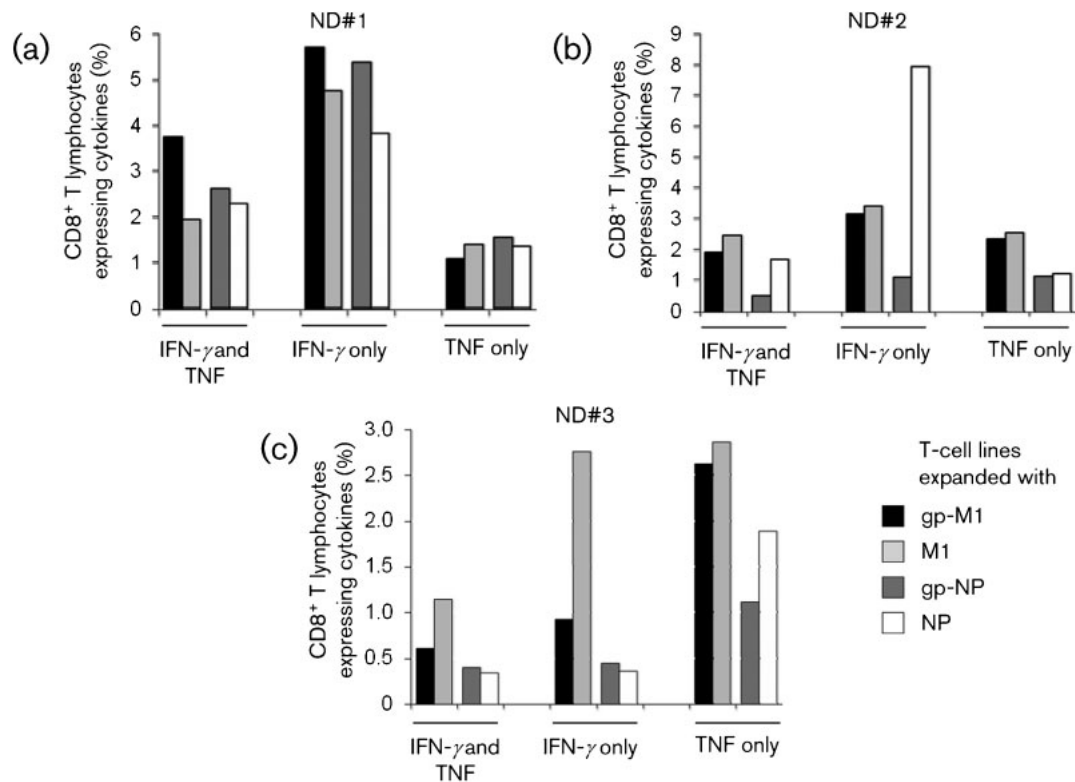


1) protein (white bars), and presented to CD8<sup>+</sup> (c) or CD4<sup>+</sup> (d) T-cell clones specific to each antigen. IFN- $\gamma$  secretion was assessed by ELISA. The data are representative of two independent experiments. (e) Expression of the M1 and gp-M1 plasmids was evaluated by Western blot of transfected HEK-293T cells ( $\beta$ -actin as control). The data are representative of three independent experiments. (f) Intracellular staining and flow cytometry analysis of NP and gp-NP expression from transfected HEK-293T. The data are representative of two independent experiments.



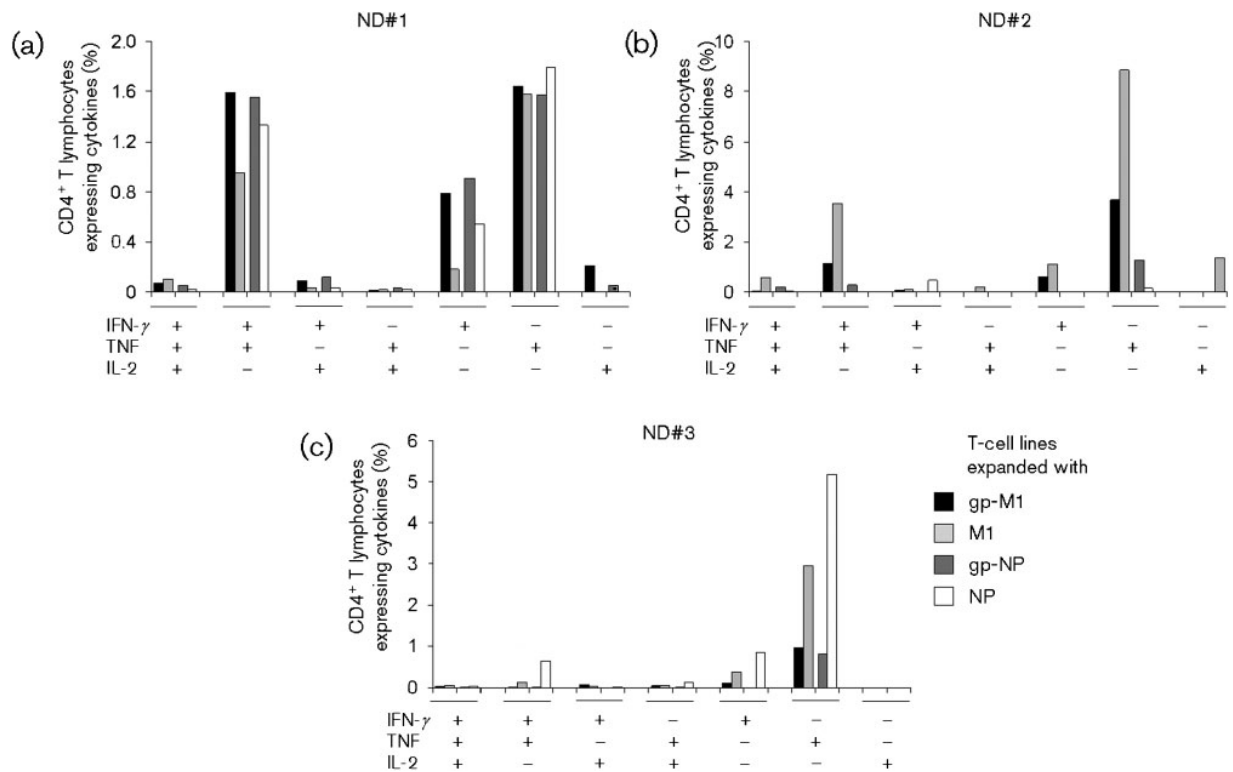
**Fig. 2. Characterization of human T lymphocytes expanded by in vitro sensitization with endogenously expressed M1 and NP.**

NP- and M1-specific T lymphocytes were expanded from PBMCs with autologous APCs expressing WT proteins or optimized versions of MHC-II presentation as described in Methods. The specificity of expanded T-cell lines was assessed by co-culture with APCs expressing M1, gp-M1 (a), NP or gp-NP (b), and IFN- $\gamma$  secretion was assessed by ELISA. Where indicated, MHC restriction was identified by the addition of MHC-I (black arrow) or -II (white arrow) -blocking antibodies from ND#1, #2 and #3 T-cell lines grown as described in Methods. (c, d) The specificity of MHC-blocking antibodies was assessed with M1-specific CD8<sup>+</sup> and NP-specific CD4<sup>+</sup> T-cell clones for ND#1 and #2 (c) and ND#3 (d). Bars represent the mean $\pm$ SD of duplicate cultures.



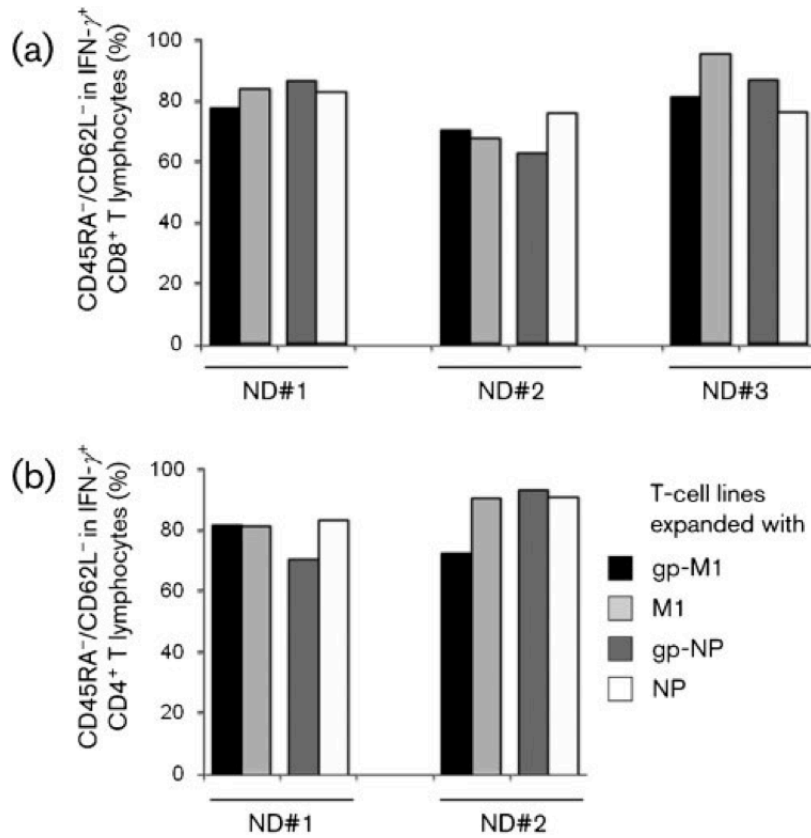
**Fig. 3. Effector cytokine secretion by CD8+ T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.**

T-cell lines were stained intracellularly for TNF, IFN- $\gamma$  and IL-2 after 6 h of stimulation by CD40-B cells electroporated with relevant (cognate) or mock antigens. However, no IL-2 was detected in any of the CD8+ T-cell lines and was excluded from the analysis. (a, b) The percentage of CD3+/CD8+ T lymphocytes producing both TNF and IFN- $\gamma$  was analysed in cell lines from three NDs cultured with CD40-B electroporated with M1 and NP, with or without gp100 MHC-II mobilization sequences. The background of mock-stimulated CD8+ T-cell lines was subtracted from the antigen-specific signal (see Supplementary Fig. S3b, available in JGV Online). Cytokine secretion from ND#1 (a) and #2 (b) was assessed with the same target as used for expansion, while cytokine secretion for ND#3 (c) was assessed with targets deprived of gp100 mobilization sequences.



**Fig. 4. Effector cytokine secretion by CD4+ T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.**

T-cell lines from three NDs were cultured, stimulated and stained as in Fig. 3. The percentage of CD3+/CD4+ T cells producing TNF, IFN- $\gamma$  or IL-2 was analysed after co-culture with APCs expressing M1 and NP, with or without gp100 MHC-II mobilization sequences. The background of mock-stimulated CD4+ T-cell lines was subtracted from the antigen-specific signal (Supplementary Fig. S2b). Cytokine production from ND #1 (a) and #2 (b) T-cell lines was assessed with the same target as used for expansion, while cytokine secretion for ND#3 (c) was assessed with targets deprived of gp100 mobilization sequences.



**Fig. 5. Surface effector phenotype of T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation.**

T-cell lines from NDs were cultured, stimulated and stained as described in Methods. (a) The percentage of CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup> effector CD8<sup>+</sup> T cells from three NDs was analysed after co-culture with APCs expressing M1 or NP, with or without gp100 MHC-II mobilization sequences. Cytokine secretion and surface marker expression from ND#1 and #2 were assessed with the same target as used for expansion, while cytokine secretion for ND#3 was assessed with targets deprived of gp100 mobilization sequences for ND#3. (b) The same analysis performed in (a) was used for CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup> effector CD4<sup>+</sup> T cells of M1- or NP-specific T-cell lines from ND#1 and #2.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; grant # PAN-83153). R.L. and J.-D.D. are recipients of scholarships from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). N.A. holds a Donald Paty Career Development Award from the Multiple Sclerosis Society of Canada and a Chercheur-Boursier from the FRSQ. The authors thank Jessica Godin-Ethier and Méliissa Mathieu for helpful discussions, Alexandre Reuben for careful reading of this manuscript and Ovid Silva and the CRCHUM Research Support Office (Bureau d'aide à la recherche) for manuscript editing. The authors declare no competing financial interests.

## References

- Wu, H., Quyyumi, F., Garg, S., Altman, J. D. & other authors (2009). The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8<sup>+</sup> T cell response. *J Immunol* 183, 7919–7930.
- Bachmann, M. F., Wolint, P., Schwarz, K., Jaeger, P. & Oxenius, A. (2005). Functional properties and lineage relationship of CD8<sup>+</sup> T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor  $\alpha$  and CD62L. *J Immunol* 175, 4686–4696.
- Baumgarth, N. & Kelso, A. (1996). In vivo blockade of gamma interferon affects the influenza virus-induced humoral and the local cellular immune response in lung tissue. *J Virol* 70, 4411–4418.
- Bednarek, M. A., Sauma, S. Y., Gammon, M. C., Porter, G., Tamhankar, S., Williamson, A. R. & Zweerink, H. J. (1991). The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol* 147, 4047–4053.
- Berkhoff, E. G. M., de Wit, E., Geelhoed-Mieras, M. M., Boon, A. C. M., Symons, J., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Rimmelzwaan, G. F. (2006). Fitness costs limit escape from cytotoxic T lymphocytes by influenza A viruses. *Vaccine* 24, 6594–6596.
- Boettler, T., Panther, E., Bengsch, B., Nazarova, N., Spangenberg, H. C., Blum, H. E. & Thimme, R. (2006). Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 80, 3532–3540.
- Boon, A. C. M., de Mutsert, G., Graus, Y. M. F., Fouchier, R. A. M., Sintnicolaas, K., Osterhaus, A. D. M. E. & Rimmelzwaan, G. F. (2002). The magnitude and specificity of influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in humans is related to HLA-A and -B phenotype. *J Virol* 76, 582–590.
- Bui, H.-H., Peters, B., Assarsson, E., Mbawuike, I. & Sette, A. (2007). Ab and T cell epitopes of influenza A virus, knowledge and opportunities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 246–251.
- Deng, Y., Jing, Y., Campbell, A. E. & Gravenstein, S. (2004). Age-related impaired type 1 T cell responses to influenza: reduced activation ex vivo, decreased expansion in CTL culture in vitro, and blunted response to influenza vaccination in vivo in the elderly. *J Immunol* 172, 3437–3446.
- De Rosa, S. C., Lu, F. X., Yu, J., Perfetto, S. P., Falloon, J., Moser, S., Evans, T. G., Koup, R., Miller, C. J. & Roederer, M. (2004). Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol* 173, 5372–5380.
- Doucet, J.-D., Gauchat, D. & Lapointe, R. (2010). Identification of influenza T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chasing technique. In *Canadian Pandemic Preparedness Meeting: Outcomes, Impacts and Lessons Learned*, abstract on p. 45. Montreal, Quebec, Canada: Public Health Agency of Canada. <http://www.ppsri-irscip.ca/print/handbook-010.pdf>, accessed 21 February 2011.
- Epstein, S. L., Tumpey, T. M., Misplon, J. A., Lo, C. Y., Cooper, L. A., Subbarao, K., Renshaw, M., Sambhara, S. & Katz, J. M. (2002). DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis* 8, 796–801.

- Furuya, Y., Chan, J., Regner, M., Lobigs, M., Koskinen, A., Kok, T., Manavis, J., Li, P., Müllerbacher, A. & Alsharifi, M. (2010). Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by gamma-irradiated influenza A viruses. *J Virol* 84, 4212–4221.
- Gschoesser, C., Almanzar, G., Hainz, U., Ortin, J., Schonitzer, D. Schild, H., Saurwein-Teissl, M. & Grubeck-Loebenstein, B. (2002). CD4+ and CD8+ mediated cellular immune response to recombinant influenza nucleoprotein. *Vaccine* 20, 3731–3738.
- Gue' guen, M. & Long, E. O. (1996). Presentation of a cytosolic antigen by major histocompatibility complex class II molecules requires a long-lived form of the antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14692– 14697.
- Heiny, A. T., Miotto, O., Srinivasan, K. N., Khan, A. M., Zhang, G. L., Brusica, V., Tan, T. W. & August, J. T. (2007). Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS ONE* 2, e1190.
- Hikono, H., Kohlmeier, J. E., Ely, K. H., Scott, I., Roberts, A. D., Blackman, M. A. & Woodland, D. L. (2006). T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections. *Immunol Rev* 211, 119–132.
- Jameson, J., Cruz, J., Terajima, M. & Ennis, F. A. (1999). Human CD8+ and CD4+ T lymphocyte memory to influenza A viruses of swine and avian species. *J Immunol* 162, 7578–7583.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. & Schoenberger, S. P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852–856.
- Jaraquemada, D., Marti, M. & Long, E. O. (1990). An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* 172, 947– 954.
- Kim, J. H. & Jacob, J. (2009). DNA vaccines against influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 333, 197–210.
- Kohlmeier, J. E., Miller, S. C., Smith, J., Lu, B., Gerard, C., Cookenham, T., Roberts, A. D. & Woodland, D. L. (2008). The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8+ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity* 29, 101–113.
- Kreijtz, J. H., de Mutsert, G., van Baalen, C. A., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D. & Rimmelzwaan, G. F. (2008). Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus. *J Virol* 82, 5161– 5166.
- Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. & Hwu, P. (2003). CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 63, 2836–2843.
- Lee, L. Y., Ha, L. A., Simmons, C., de Jong, M. D., Chau, N. V., Schumacher, R., Peng, Y. C., McMichael, A. J., Farrar, J. J. & other authors (2008). Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J Clin Invest* 118, 3478–3490.
- Lepage, S. & Lapointe, R. (2006). Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments. *Cancer Res* 66, 2423–2432.



- Maecker, H. T., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H. & Levy, S. (1998). Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependence on antigen presentation via class II MHC. *J Immunol* 161, 6532–6536.
- McMichael, A. J., Gotch, F. M., Noble, G. R. & Beare, P. A. (1983). Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med* 309, 13–17.
- Miller, J. D., van der Most, R.G., Akondy, R. S., Glidewell, J. T., Albott, S., Masopust, D., Murali-Krishna, K., Mahar, P. L., Edupuganti, S. & Lalor, S. (2008). Human effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 28, 710–722.
- Moss, R. B. (2009). Prospects for control of emerging infectious diseases with plasmid DNA vaccines. *J Immune Based Ther Vaccines* 7, 3. <http://www.jibtherapies.com/content/7/1/3>
- Mueller, S. N., Langley, W. A., Carnero, E., Garcí'a-Sastre, A. & Ahmed, R. (2010). Immunization with live attenuated influenza viruses that express altered NS1 proteins results in potent and protective memory CD8<sup>+</sup> T-cell responses. *J Virol* 84, 1847–1855.
- Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C. & Iwasaki, A. (2009). CD8<sup>+</sup> T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4<sup>+</sup> T cell help. *Nature* 462, 510–513.
- Nuchtern, J. G., Biddison, W. E. & Klausner, R. D. (1990). Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 343, 74–76.
- Pelletier, S., Tanguay, S., Lee, S., Gunaratnam, L., Arbour, N. & Lapointe, R. (2009). TGF- $\alpha$  as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1207–1218.
- Price, G. E., Soboleski, M. R., Lo, C.-Y., Mispion, J. A., Pappas, C., Houser, K. V., Tumpey, T. M. & Epstein, S. L. (2009). Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A viruses. *Vaccine* 27, 6512–6521.
- Rush, C., Mitchell, T. & Garside, P. (2002). Efficient priming of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways. *J Immunol* 169, 4951–4960.
- Schmid, D., Pypaert, M. & Münz, C. (2007). Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 26, 79–92.
- Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Delgado, J. C., Gribben, J. G. & Nadler, L. M. (1997). CD40- activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* 100, 2757–2765.
- Schweiger, B., Zadow, I. & Heckler, R. (2002). Antigenic drift and variability of influenza viruses. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 191, 133–138.
- Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 8, 247–258.
- Skountzou, I., Koutsonanos, D. G., Kim, J. H., Powers, R., Satyabhama, L., Masseoud, F., Weldon, W. C., Martin, M. P., Mittler, R. S. & other authors (2010). Immunity to pre-1950 H1N1 influenza viruses confers cross-protection against the pandemic swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus. *J Immunol* 185, 1642–1649.
- Swain, S. L., Agrewala, J. N., Brown, D. M., Jelley-Gibbs, D. M., Golech, S., Huston, G., Jones, S. C., Kamperschroer, C., Lee, W.-H. & other authors (2006). CD4<sup>+</sup> T-cell memory:

- generation and multifacete roles for CD4<sup>+</sup> T cells in protective immunity to influenza. *Immunol Rev* 211, 8–22.
- Taylor, P. M. & Askonas, B. A. (1986). Influenza nucleoproteinspecific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. *Immunology* 58, 417–420.
- Teijaro, J. R., Verhoeven, D., Page, C. A., Turner, D. & Farber, D. L. (2010). Memory CD4 T cells direct protective responses to influenza virus in the lungs through helper-independent mechanisms. *J Virol* 84, 9217–9226.
- Thomas, P. G., Keating, R., Hulse-Post, D. J. & Doherty, P. C. (2006). Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis* 12, 48–54.
- Touvrey, C., Derre', L., Devevre, E., Corthesy, P., Romero, P., Rufer, N. & Speiser, D. E. (2009). Dominant human CD8 T cell clonotype persist simultaneously as memory and effector cells in memory phase. *J Immunol* 182, 6718–6726.
- Turcotte, S., Forget, M.-A., Beauseigle, D., Nassif, E. & Lapointe, R. (2007). Prostate-derived Ets transcription factor overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer. *Neoplasia* 9, 788–796.
- Van den Bosch, G. A., Van Gulck, E., Ponsaerts, P., Nijs, G., Lenjou, M., Apers, L., Kint, I., Heyndrickx, L., Vanham, G. & other authors (2006). Simultaneous activation of viral antigen-specific memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells using mRNA-electroporated CD40-activated autologous B-cells. *J Immunother* 29, 512–523.
- Voo, K. S., Fu, T., Heslop, H. E., Brenner, M. K., Rooney, C. M. & Wang, R.-F. (2002). Identification of HLA-DP3-restricted peptides from EBNA1 recognized by CD4<sup>+</sup> T cells. *Cancer Res* 62, 7195–7199
- WHO (2009). Pandemic (H1N1) 2009. <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>, accessed 10 March 2010.
- Zhirnov, O. P., Isaeva, E. I., Konakova, T. E., Thoidis, G., Piskareva, L. M., Akopova, I. I., Kartashov, A., Altstein, A. D., Ilyinskii, P. O. & Shneider, A. M. (2007). Protection against mouse and avian influenza A strains via vaccination with a combination of conserved proteins NP, M1 and NS1. *Influenza Other Respir Viruses* 1, 71–79.
- Zhou, Z., Jiang, X., Liu, D., Fan, Z., Hu, X., Yan, J., Wang, M. & Gao, G. F. (2009). Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy* 5, 321–328.