

Université de Montréal

Rôle de CD271 dans l'immunomodulation des cellules T

par

Carole Arlette Bonkougou

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès Sciences
en microbiologie, immunologie

Avril, 2018

© Carole Arlette Bonkougou, 2018

Ce mémoire intitulé

Rôle de CD271 dans l'immunomodulation des cellules T

présenté par Carole Arlette Bonkougou

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Sylvie Lesage

Président-rapporteur

Dr Heather Melichar

Directrice de recherche

Dr Hugo Soudeyns

Membre du jury

RÉSUMÉ

Les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans le développement des réponses immunitaires spécifiques à un antigène donné. Ils participent à plusieurs réactions immunitaires impliquant le contrôle des maladies infectieuses et des cancers mais peuvent aussi contribuer à la genèse de maladies auto-immunes. Il est donc très important de contrôler la durée et l'amplitude de la réponse immunitaire. À cet effet, la fonction des cellules T est régulée par un vaste réseau de molécules de costimulation et de coinhibition. Ces molécules de cosignalisation sont des modulateurs essentiels du système immunitaire et sont des membres de la superfamille des immunoglobulines ou des récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TNFRSF). Malgré de nombreuses études menées sur les protéines de ces deux superfamilles, la fonction de plusieurs d'entre elles reste encore inconnue. Parmi ceux-ci, on compte CD271, le récepteur de facteur de croissance neuronal de faible affinité (aussi connue sous le nom de NGFR, p75NTR, et TNFRSF16), un membre de la TNFRSF. En effet, le CD271, qui est exprimé à la surface des tissus dérivés de la crête neurale, peut également être exprimé par différentes cellules cancéreuses, par certaines cellules hématopoïétiques telles que les cellules dendritiques et par plusieurs types de cellules immunorégulatrices telles que les cellules stromales mésenchymales et les cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde, suggérant ainsi qu'il pourrait être impliqué dans la régulation des réponses immunitaires. Par contre, il existe très peu d'information sur le rôle de CD271 sur la fonction des cellules T. Récemment, une étude a montré que l'expression de CD271 par les cellules de mélanome module indirectement la fonction des cellules T via une baisse de l'expression des antigènes tumoraux dépendante du NGF, permettant ainsi à la tumeur d'échapper à la surveillance immunitaire. Par ailleurs, en plus de son interaction canonique avec les neurotrophines, il a été démontré que CD271 interagit avec le CD80 humain. Le CD80 est une molécule de costimulation majeure, principalement exprimée par les cellules présentatrices d'antigène, mais dont l'expression peut être augmentée par les cellules T activées au niveau desquelles il joue un rôle immunomodulateur. Cependant, il n'a pas encore été déterminé si CD271 module directement la réponse immunitaire. Étant donné que plusieurs membres de la TNFRSF interagissent directement avec les cellules T pour moduler leur réponse, nous avons émis l'hypothèse que CD271 est capable de réguler directement la fonction des cellules T. Grâce à un système *in vitro*, nous avons montré que la

protéine recombinante CD271-Fc inhibe l'activation, la prolifération et la production de cytokines des cellules T humaines. Cependant, notre étude suggère que l'interaction entre CD271 et CD80 est spécifique à l'humain. Malgré cette spécificité, elle inhibe l'activation des cellules T murines, suggérant ainsi que CD271 agit aussi indépendamment de CD80 pour moduler la fonction des cellules T. Notre étude identifie donc CD271 comme une nouvelle molécule de cosignalisation potentiellement impliquée dans la régulation de la fonction des cellules T et dont la caractérisation pourrait mener au développement d'éventuelles thérapies anti-cancer.

Mots clés : CD271, CD80, cellules T, cosignalisation, immunomodulation, immunothérapie, superfamille des récepteurs de facteurs de nécrose tumorale, superfamille des immunoglobulines, cancer.

ABSTRACT

T lymphocytes play a pivotal role in the development of the immune response specific to a given antigen. They play an important role in the recognition and elimination of abnormal cells such as cancer cells or those infected with a pathogen. However, dysregulation of T cell function can lead to the development of autoimmune diseases. Thus, it is crucial to modulate the duration and the amplitude of the immune response. To this end, T cell function is tightly regulated by a network of costimulatory and coinhibitory molecules. These cosignaling molecules are essential modulators of the immune system and belong to the immunoglobulin and tumor necrosis factor receptor superfamilies (IgSF and TNFRSF). Despite intensive study of these protein families, the function for many IgSF and TNFRSF members remain largely unknown. CD271, the low affinity nerve growth factor receptor (NGF) (also known as NGFR, p75 neurotrophin receptor, and TNFRSF16) is particularly intriguing. In addition to its expression on neural crest-derived cells, CD271 is also expressed on diverse cancer cells and hematopoietic cells such as dendritic cells, as well as immunomodulatory cell types including mesenchymal stromal cells and myeloid-derived suppressor cells, suggesting that CD271 may be involved in the regulation of immune responses. Yet, little is known about its immunomodulatory properties. It has recently been shown that CD271 expression on melanoma cells can indirectly modulate T cell function through NGF-dependent downregulation of tumor antigens, thus allowing cancer immune evasion. Beyond the canonical neurotrophins, it has been suggested that CD271 binds to human CD80, a major costimulatory molecule mainly expressed on antigen presenting cells but that is also up-regulated on T cells after activation where it performs immunomodulatory functions. However, direct modulation of the immune response by CD271 has not yet been considered. Given that several members of the TNFRSF directly interact with T cells to modulate their function, we hypothesized that CD271 can directly modulate T cell function. Using *in vitro* T cell activation systems, we show that recombinant CD271-Fc protein inhibits T cell activation, proliferation, and production of pro-inflammatory cytokines. However, our studies suggest that the interaction of CD271 and CD80 is human specific, and CD271 also inhibits murine T cell activation, suggesting that CD271 acts independently of CD80 binding to modulate T cell function. Our studies identify CD271 as a

potential cosignaling molecule implicated in the regulation of T cell function. Thus, further characterization of CD271 could lead to the development of anti-cancer therapies.

Keywords : CD271, CD80, T cell, cosignaling, immunomodulation, immunotherapy, tumor necrosis factor receptor superfamily, immunoglobulin superfamily, cancer.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS ET SIGLES	x
PRÉFACE.....	xiv
REMERCIEMENTS	xiv
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Le système immunitaire.....	1
1.1.1 Le développement de la réponse immunitaire	2
1.1.2 Les cellules dendritiques.....	3
1.1.3 Les lymphocytes T.....	4
1.1.3.1 Le développement des lymphocytes T.....	5
1.1.3.2 L'activation des cellules T	6
1.1.3.2.1 Signal 1 : L'interaction TCR-CMH-peptide	7
1.1.3.2.2 Signal 2 : Molécules de costimulation	8
1.1.3.2.3 Signal 3 : Cytokines	11
1.2 Les mécanismes de contrôle de la réponse immunitaire	13
1.2.1 Les molécules de coinhibition.....	13
1.2.2 Les mécanismes de coinhibition.....	13
1.3 Implication des molécules de cosignalisation dans les maladies auto-immunes et le cancer.....	15
1.3.1 Implication des molécules de cosignalisation dans la prévention des maladies auto-immunes	15
1.3.2 Implication des molécules de cosignalisation dans l'évasion tumorale.....	18
1.3.3 L'immunothérapie anti-cancer ciblant les molécules de cosignalisation.....	20
1.4 CD271	23
1.4.1 Expression et fonction de CD271 dans le système immunitaire.....	24

1.5 Rationnelle, hypothèse et objectifs spécifiques	26
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	27
2.1 Réactifs et milieux.....	27
2.2 Obtention des lymphocytes T humains	28
2.3 Modèles murins	28
2.4 Marquage au carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester (CFSE).....	29
2.5 Activation des cellules T humaines et murines.....	29
2.6 Marquage extracellulaire et intracellulaire des cellules T.....	29
2.7 Mutagénèse dirigée.....	30
2.8 Test de liaison.....	32
2.9 Technique de résonance plasmonique de surface (SPR).....	32
2.10 Statistiques.....	33
3 RÉSULTATS	34
3.1 CD271 interagit spécifiquement avec le CD80 humain.....	34
3.2 CD271 se lie uniquement aux cellules exprimant de hauts niveaux de CD80.....	37
3.3 L'affinité de l'interaction CD271-CD80 est intermédiaire à celle de CTLA-4-CD80 et CD28-CD80.....	39
3.4 Les régions riches en cystéines C1 et C2 de CD271 ne sont pas nécessaires pour l'interaction de CD271 avec CD80.....	41
3.5 Deux acides aminés dans le domaine V du CD80 humain sont importants pour la liaison de CD271.....	44
3.6 CD271 inhibe l'activation, la prolifération et la production de cytokines des cellules T humaines	46
3.7 CD271 inhibe également la prolifération des cellules murines <i>in vitro</i>	51
4 DISCUSSION	53
4.1 L'interaction interfamille IgSF-TNFRSF	53
4.2 La spécificité et les sites de l'interaction entre CD80 et CD271	54

4.3 Mutation des résidus riches en cystéine de CD271.....	55
4.4 L'affinité de l'interaction de CD80-CD271.....	55
4.5 L'interaction de CD271 avec les DC et ses conséquences.....	56
4.6 L'interaction de CD271 avec les cellules T.....	57
4.7 Mécanismes alternatifs d'inhibition par CD271	59
5 PERSPECTIVES.....	60
6 CONCLUSION	61
7 RÉFÉRENCES.....	62
8 ANNEXE	78
8.1 Formulaire de consentement	78
8.2 Séquence d'amorces	87

LISTE DES FIGURES

1 Introduction

Figure 1 Les différentes étapes de l'activation des cellules T

Figure 2 Impact du signal 3 sur la différenciation des cellules T CD4+

2 Matériels et méthodes

Figure 3 : Schéma d'un domaine riche en cystéine de CD271

3 Résultats

Figure 4 CD271 se lie spécifiquement au CD80 humain

Figure 5 CD271 se lie uniquement aux cellules exprimant de haut niveau de CD80

Figure 6 L'affinité de l'interaction CD271-CD80 est intermédiaire à celle de CTLA-4-CD80 et CD28-CD80

Figure 7 Les régions riches en cystéine 1 et 2 du CD271 humain ne sont pas nécessaires pour son interaction avec le CD80

Figure 8 Deux acides aminés dans le domaine V du CD80 humain sont importants pour la liaison de CD271

Figure 9 CD271 inhibe l'activation des cellules T humaines

Figure 10 CD271 inhibe la prolifération des cellules T humaines

Figure 11 CD271 inhibe la production de cytokine des cellules T humaines

Figure 12 CD271 inhibe la prolifération des cellules T humaines

Figure 13 L'inhibition de la prolifération des cellules T murines par CD271 est indépendante de CD80

4 Discussion

Figure 14 L'interaction entre le CD271 et son (ses) ligand(s) peut moduler la fonction des cellules présentatrices

Figure 15 L'interaction entre le CD271 et son (ses) ligand(s) peut moduler la fonction des cellules T

8 Annexe

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée du CD271 humain

LISTE DES ABBRÉVIATIONS ET SIGLES

ADN: Acide désoxyribonucléique

AIRE: Régulateur de l'auto-immunité

AKT: Protéine kinase B

ARN: Acide ribonucléique

BATF : «Basic leucine zipper transcription factor»

Bcl6: «B cell lymphoma 6»

BDNF: Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BTLA: Atténuateur de cellules B et T

BCR: Récepteur de cellule B

Bcl-XL: «B cell lymphoma extra large»

BSA: Albumine de sérum bovin

CD: Cluster de différenciation

CFSE: «Carboxyfluorescein succinimidyl ester»

CLR: Récepteur de type lectine C

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: Cellules présentatrice d'antigène

cSMAC: Complexe supramoléculaire d'adhésion central

cTEC: Cellule épithéliale thymique corticale

CTL: Cellule T cytotoxique

CTLA-4: Antigène associé aux cellules T cytotoxiques

DAMPs: Motif moléculaire associé au dommage cellulaire

DC: Cellule dendritique

DMEM: Dubelcco's modified Eagle's medium

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DN: Double négatif (CD4-CD8-)

dNTP: Desoxynucléotide triphosphate

DP: Double positif (CD4+CD8+)

EAE: Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

FBS: Fœtal bovin serum

FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FEZF2: «FEZ family zinc finger 2»

FOXP3: «Forkhead box P3»

GATA3: «GATA binding protéine 3»

ICOS: Costimulateur Inductible de cellule T

IDO: Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN Interféron

IgSF: Superfamille des immunoglobulines

IL: Interleukine

ITAM: «Immunoreceptor tyrosine-based activation motif»

iTreg: Cellule T régulatrice induite

LAG-3: Gène 3 de l'activation des lymphocytes

LFA-1: Antigène 1 associé à la fonction lymphocytaire

LRBA: «Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein»

MDSC: Cellule suppressive de la lignée myéloïde

MFI: Intensité moyenne de fluorescence

MSC: Cellules stromales mésenchymateuses

mTEC: Cellule épithéliale thymique médullaire

mTOR: Cible fonctionnelle de la rapamycine

NGF: Facteur de croissance neuronal

NK: Cellule natural killer

NLR: Récepteur de type NOD

PAMPs: Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PBS: «Phosphate buffered saline»

PCR: Réaction de polymérisation en chaîne

PD-1: Protéine de mort cellulaire programmée 1

PD-L: Ligand de la protéine de mort cellulaire programmée

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PRR: Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

pSMAC: Complexe supramoléculaire d'adhésion périphérique

RIG-I: Récepteur induit par l'acide rétinoïque

ROR γ t: RAR-related orphan receptor gamma

RPMI: «Roswell Park Memorial Institute medium»

SI: Synapse immunologique

SPR: Résonance plasmonique de surface

STAT3: Transducteur de signal et activateur de transcription 3

TCR: Récepteur de cellule T

T bet: Le facteur de transcription à boîte T TBX21

TGF: Facteur de croissance transformant

TNF: Facteur de nécrose tumoral

T_H: Cellule T auxiliaire

TIL: Cellule T infiltrant la tumeur

TIM-3: Immunoglobuline de cellule T et protéine de mucine 3

TLR: Récepteur de type toll

TME: Microenvironnement tumoral

TNFRSF: Superfamille des récepteurs de facteurs de nécrose tumorale

TRAF: Facteur associé au TNF

TrkA: Récepteur tyrosine kinase A

TSA: Antigène spécifique de tissus périphériques

WT: Type sauvage

ZAP-70: Protéine kinase 70 associée à la chaîne zeta

PRÉFACE

Ce mémoire est l'aboutissement de mon projet de maîtrise intitulé « Rôle de CD271 dans l'immunomodulation des cellules T ». Mes travaux de recherche se sont déroulés dans le laboratoire du Dr Heather Melichar au Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Lors de ce projet, j'ai réalisé les activations lymphocytaires *in vitro*. J'ai également accompli les tests de liaison *in vitro*. Le Dr Marilaine Fournier a contribué à la génération des protéines CD271 humaines mutantes. Le test d'affinité utilisant la méthode de résonance plasmonique de surface (SPR) a été réalisé par le Dr Mark Hancock de l'Université McGill.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Heather Melichar de m'avoir offert l'opportunité de réaliser mes travaux de maîtrise dans son laboratoire. Je lui dis merci pour sa patience, son encadrement et sa rigueur scientifique. Grâce au Dr Melichar, j'ai vécu une expérience de laquelle je sors grandie non seulement au niveau professionnel mais également au niveau personnel.

Je voudrais aussi remercier les membres du laboratoire avec lesquels j'ai passé de très beaux moments et qui n'ont pas hésité à m'aider quand j'en avais besoin. Finalement, un immense merci à ma famille pour leur soutien. Spécialement à mon père et à ma mère qui m'ont soutenue sur plusieurs plans. Sans vous, il aurait été beaucoup plus difficile pour moi d'en arriver là où je suis aujourd'hui.

Je dédicace ces pages de mon mémoire à mes grands-parents.

1 INTRODUCTION

1.1 Le système immunitaire

Il existe deux types de mécanisme de défense du système immunitaire qui collaborent pour assurer la protection de l'organisme en éliminant les agents pathogènes et les cellules anormales telles que les cellules tumorales tout en préservant son équilibre et son bon fonctionnement (1, 2). En effet, le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif coopèrent pour assurer une réponse immunitaire efficace, spécifiquement dirigée contre les pathogènes ou les cellules anormales sans porter atteinte à l'intégrité de l'organisme (1, 2). Ces deux types de mécanisme de défense possèdent des caractéristiques différentes. D'une part, le système immunitaire inné génère une réponse immunitaire rapide suite à la reconnaissance de motifs moléculaires communs aux pathogènes (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), mais aussi à la présence de différents facteurs associées au stress ou à la mort cellulaire (*damage-associated molecular pattern*, DAMP) (1, 3, 4). D'autre part, il y a le système immunitaire adaptatif qui, quant à lui, prend plus de temps à se mettre en place, mais génère une réponse immunitaire permettant d'éliminer de manière spécifique les pathogènes ou les cellules anormales qui n'ont pas pu être éliminés par la réponse innée (1, 5). En plus de sa spécificité, le système immunitaire adaptatif génère une mémoire immunologique qui assure une réponse plus rapide lors d'une seconde infection (1, 5, 6). Malgré leurs différences, l'immunité innée et l'immunité adaptative fonctionnent de manière interdépendante car les composantes de l'immunité innée influencent le système adaptatif et vice versa.

Une grande diversité de cellules différenciées à partir de cellules souches hématopoïétiques constitue les éléments fonctionnels des deux types de réponse immunitaires. Les acteurs principaux de la réponse immunitaire innée sont les cellules dendritiques (DC), les monocytes, les macrophages, les granulocytes et les cellules natural killer (NK) (1). Ces cellules expriment différents récepteurs de reconnaissance des PAMPs et des DAMPs (*pathogen recognition receptor*, PRR) qui sont des récepteurs invariables codés par l'acide désoxyribonucléique (ADN) germinale (7). Ils sont exprimés à la surface ou à l'intérieur des cellules, ce qui permet de détecter des pathogènes extra ou intra cellulaires. La réponse

immunitaire adaptative, quant à elle, est assurée par les lymphocytes T et B dont les récepteurs de surface, issus de recombinaisons génétiques, sont très diversifiés. Le récepteur des cellules T est le « T cell receptor » (TCR) et les cellules B portent à leur surface un récepteur de type immunoglobuline appelé « B cell receptor » (BCR) (8, 9). En général, chaque TCR et BCR est unique et, contrairement aux PRR, ils ne reconnaissent pas de motifs conservés mais présentent une spécificité distincte pour différents peptides antigéniques, assurant ainsi la spécificité de la réponse immunitaire acquise (8, 9).

1.1.1 Le développement de la réponse immunitaire

Lorsque qu'un hôte est infecté par des agents pathogènes, les PRR tels que les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptors*, TLRs), les récepteurs de type NOD (*NOD-like receptors*, NLR), ceux de type RIG-I (*RIG-I like receptors*, RLR) ainsi que des récepteurs de lectine de type C (*C-type lectin receptors*, CLR), reconnaissent les PAMPs (10, 11). Dans le cas de stress ou mort cellulaire, ce sont les DAMPs qui sont détectés. Suite à la reconnaissance des PAMPs ou DAMPs, la réponse immunitaire innée est induite et conduite à travers différents mécanismes cellulaires et différents facteurs sécrétés (12). Certains de ces facteurs sécrétés comme les chimiokines et les cytokines participent au recrutement et à l'activation de cellules immunitaires innées telles que les neutrophiles, les macrophages et les DC au site de l'inflammation dont le rôle sera de se débarrasser des particules étrangères et des débris cellulaires par phagocytose (13).

Les DC, les macrophages, mais également les monocytes et les cellules B, sont appelées cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Suite à l'internalisation de pathogènes ou de débris cellulaires, elles sont capables, via un processus de protéolyse complexe, d'exprimer à leur surface des peptides antigéniques et de les présenter aux lymphocytes T (14-16). La présentation de peptides par les CPA et la reconnaissance de ceux-ci par les cellules T, constitue une étape cruciale de l'activation des cellules T et du développement de la réponse immunitaire acquise (15).

1.1.2 Les cellules dendritiques

Les DC sont des CPA professionnelles. Elles sont considérées comme les CPA les plus efficaces et de ce fait, ont comme rôle central l'initiation de la réponse immunitaire adaptative (17). Le fait d'activer les cellules T, en plus de pouvoir stimuler directement les cellules B en leur présentant un antigène complet met l'emphase sur le rôle majeur des DC dans le développement de la réponse immunitaire acquise (18, 19). Comme d'autres cellules du système immunitaire inné, tels que les macrophages, les DC reconnaissent les pathogènes via leur PRR et les phagocytent (20). Par contre, le rôle de la phagocytose chez les DC n'est pas d'éliminer le pathogène mais de l'ingérer et d'utiliser un processus de présentation antigénique pour pouvoir communiquer la présence du pathogène aux cellules du système immunitaire adaptatif (17, 20). C'est aussi pour cela, que les DC sont considérées comme les principales cellules qui établissent un lien entre les mécanismes de défense inné et acquis du système immunitaire (17, 21). Il est important de souligner que les DC ont également une fonction significative dans le maintien de la tolérance immunitaire (22, 23). Elles sont effectivement capable via différents mécanismes d'empêcher l'avènement de réponses immunitaires auto-réactives (22, 23). La délétion de cellules T auto-réactive, l'induction de l'anergie des lymphocytes T et de l'expansion de cellules T régulatrice (Treg) sont des exemples de mécanismes utilisés par les DC pour le maintien de l'homéostasie immunitaire (22, 23).

Les DC existent sous deux états fonctionnellement distincts; ce sont l'état immature et l'état mature (21, 24). Sous leur forme immature, les DC agissent comme des cellules sentinelles en périphérie, à la recherche de pathogènes (21, 24). Elles ont une grande capacité de phagocytose et de pinocytose ce qui leur permet d'accumuler de grande quantité d'antigènes solubles et membranaires (17). Les DC immatures sont également caractérisées par une certaine incapacité à présenter les antigènes qu'elles accumulent (17). Les DC passent de l'état immature à l'état mature lorsque leurs PRR détectent les PAMPs (25). La reconnaissance des PAMPs par les PRR constitue une étape critique pour la maturation fonctionnelle des DC (25). Au cours de ce processus de maturation, les DC immatures perdent leur capacité de phagocytose, activent leur machinerie d'apprêtement d'antigènes et augmentent leur expression de molécules de costimulation et de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMHI et CMHII) (21).

L'augmentation de l'expression des molécules du CMH par les DC matures est un des processus primordiaux pour l'activation des cellules T. En effet, ces molécules possèdent des cavités à l'intérieur desquelles les peptides antigéniques se fixent pour être présentés aux lymphocytes T conventionnelles et exceptionnellement à certains sous types de cellules T non conventionnel qui, autrement, sont incapables de reconnaître des antigènes présentés en dehors du contexte du CMH (17, 26). Cependant, pour pouvoir être présenté au TCR, l'antigène doit d'abord subir le processus d'apprêtement antigénique qui se fait par deux voies différentes, soit la voie endocytaire ou cytosolique en fonction du type d'antigène (27). En général, la voie d'apprêtement endocytaire est utilisée par les DC en présence d'antigènes d'origine extracellulaires tels que les bactéries ou les allergènes qu'elles ont internalisés par endocytose (27, 28). Par contre, les antigènes endogènes, c'est-à-dire générés à l'intérieur de la cellule, par exemple lors d'une infection virale, sont apprêtés par la voie cytosolique (27, 28). La voie d'apprêtement choisi et le type de pathogène vont également influencer le choix du CMH via lequel les peptides antigéniques seront présentés à la fin du processus d'apprêtement. Une fois internalisés, les pathogènes extracellulaires sont délivrés dans un compartiment endosomal ou lysosomal dans lesquels ils sont dénaturés et associés aux CMHII, alors que les pathogènes intracellulaires sont généralement ubiquitinés, dégradés par le protéasome et présentés par via CMHI (29).

1.1.3 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T, jouent un rôle crucial dans le déroulement de la réponse immunitaire adaptative. Tel que mentionné précédemment, elles expriment à leur membrane un récepteur spécifique à un antigène appelé TCR. Le TCR est associé de manière non covalente à un complexe protéique appelé CD3 (30). Dans l'organisme, les cellules T possédant un TCR $\alpha\beta$ se subdivisent en deux populations majeures, les cellules T CD4⁺ auxiliaires (T helper; T_H) et les cellules T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) qui peuvent être définies par leur rôle particulier (31-35). Le rôle principal des T_H est d'orienter la réponse immunitaire en sécrétant des protéines solubles appelées cytokines qui sont essentielles pour stimuler les réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale (36). Les CTL quant à eux sont les acteurs clés de la réponse immunitaire

à médiation cellulaire. Grâce à leur activité cytolytique, ils éliminent les cellules étrangères, tumorales ou celles infectées par un virus ou un parasite intracellulaire via la sécrétion de différentes substances cytotoxiques et l'expression de ligands capable de déclencher un processus de mort cellulaires des cellules cibles (37, 38).

1.1.3.1 Le développement des lymphocytes T

La génération de lymphocytes T fonctionnels se déroule dans le thymus à partir de cellules progénitrices originaires de la moelle osseuse et qui ont rejoint le thymus via la circulation sanguine (39). Les progéniteurs de cellules T entrant dans le thymus sont dans un premier stade de développement appelé double négatif (DN) caractérisé par l'absence de CD4, CD8, CD3 et TCR (40). À leur entrée dans le thymus, les DN se localisent au niveau du cortex thymique où ils entament le réarrangement de la chaîne β de leur TCR (39). Lorsque le réarrangement de la chaîne β est complété, elle s'associe à une chaîne pré-TCR α invariante et au CD3 pour former un pré-TCR (40). La formation du pré-TCR active une cascade de signalisation qui permet la survie et la prolifération des thymocytes exprimant la chaîne β et conduit à l'exclusion allélique de la chaîne β (41). Cette signalisation est initiée par l'oligomérisation spontanée du pré-TCR provoquée par la pré-TCR α (42). La cascade de signalisation permet également de débiter la progression des DN vers le stade de développement double positif (DP) caractérisé par l'expression de CD4 et CD8 et active également le réarrangement de la chaîne α du TCR (41). Les chaînes α et β du TCR sont codées par des segments géniques V (codant pour la région variable), J (codant pour la région jonctionnelle) et C (codant pour la région constante) pour α et V, D (codant pour la région diversité), J et C pour β (43, 44). Les segments géniques V et J pour α et V, D et J pour β passent à travers un processus de recombinaison qui, combiné à des additions, substitution et/ou délétion de nucléotides, contribue à la diversité et à la spécificité des TCR, assurant ainsi la reconnaissance d'un grand nombre d'antigènes différents (43, 44). À la différence du réarrangement de la chaîne β qui implique l'exclusion allélique, plusieurs réarrangement successifs ou simultanés peuvent avoir lieu sur les deux allèles de la chaîne α (45). Ainsi, les cellules T immatures peuvent co-exprimer deux chaînes α (46).

Les DP ayant réarrangés avec succès d'abord leur chaînes β et ensuite leur chaîne α , expriment un TCR $\alpha\beta$ unique dont la fonctionnalité et l'utilité vont être testées lors d'un processus de sélection positive et négative (41). La sélection positive se déroule au niveau du cortex thymique et implique l'interaction entre le TCR des DP avec différents peptides du soi qui sont présentés par les molécules du CMH des cellules épithéliales du cortex thymique (cTEC) (41, 47, 48). Suite à cette interaction, les DP dont le TCR se lie aux peptides du soi avec une affinité faible ou modérée subissent la sélection positive et s'engagent vers le stade développemental simple positif (SP) où elles se mettent à exprimer uniquement le CD4 ou le CD8, tandis que les DP dont le TCR n'interagit pas avec le complexe peptide du soi-CMH meurent par apoptose (41, 47). Les thymocytes subissent également un processus de sélection négative se déroulant principalement dans la médulla mais qui peut aussi avoir lieu dans le cortex pendant et après le stade DP (41, 48, 49). Durant ce processus, les thymocytes dont le TCR interagit trop fortement avec les peptides du soi présentés par le CMH des cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC) ou des CPA thymiques telles que les DC deviennent anergiques, sont éliminés ou convertis en d'autres types cellulaires, par exemple en Treg (47, 48, 50). À la fin du processus de sélection, des cellules T SP matures sont formées et quittent le thymus.

1.1.3.2 L'activation des cellules T

Lorsqu'une cellule T nouvellement formée quitte le thymus, elle est dite naïve car elle n'a pas encore rencontré l'antigène étranger qui lui est spécifique. À sa sortie du thymus, les cellules T naïves circulent à la périphérie et à travers les organes lymphoïdes secondaires où elles interagissent avec les CPA, notamment les DC (32, 51). Elles transitent continuellement dans ces organes lymphoïdes secondaires via les circulations sanguine et lymphatique à la recherche des DC présentant l'antigène pour lequel leur TCR est spécifique (32). La cellule T naïve devient effectrice et capable de conduire une réponse immunitaire lorsqu'elle rencontre son antigène et s'active. Cette activation requiert au moins trois signaux (Figure 1). Le TCR est directement impliqué dans l'activation des cellules T via son rôle primaire dans la médiation du signal 1. Ce premier signal a lieu lorsque la cellule T reconnaît le peptide spécifique à son

récepteur via une interaction avec le complexe CMH-peptide de la CPA (22, 52, 53). Le signal 2 provient d'autres molécules appelées molécules de costimulation et le signal 3 provient de cytokines (22). Lorsque la cellule T reçoit le signal 1 sans recevoir le signal 2 et/ou 3, elle devient anergique, c'est-à-dire qu'elle entre dans un état d'incapacité à répondre à un autre stimulus (52-54).

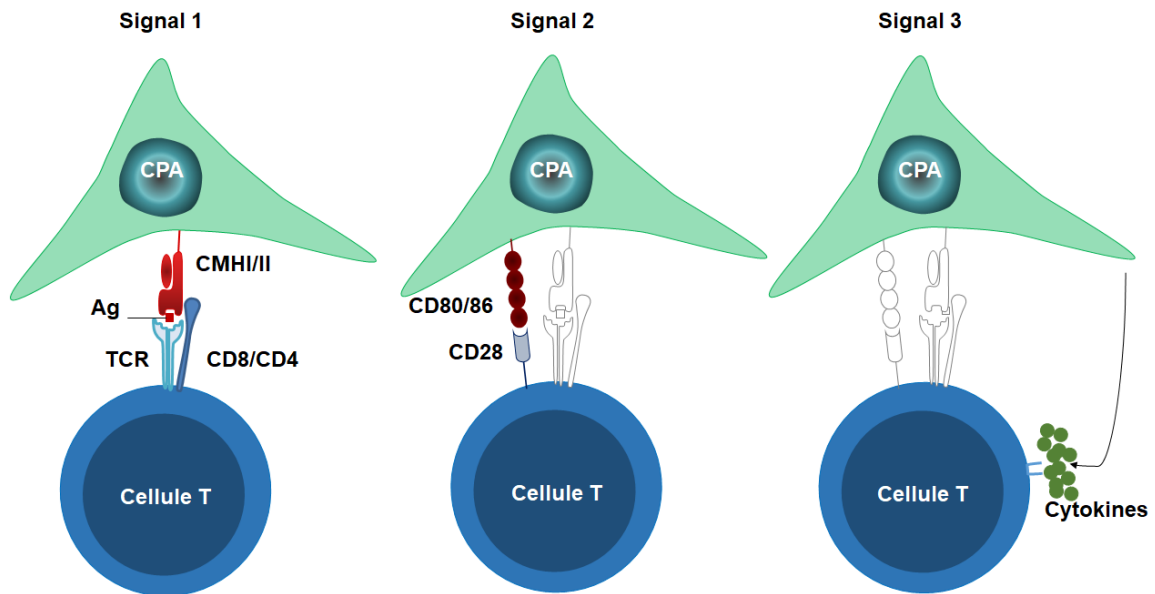


Figure 1. Les différentes étapes de l'activation des cellules T. Trois signaux sont nécessaires à l'activation des cellules T. L'interaction du récepteur de la cellule T (TCR) avec l'antigène (Ag) présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II donne lieu au signal 1. Le signal 2 a lieu lorsque la molécule de costimulation CD28 exprimée par les cellules T interagit avec les molécules CD80/CD86 des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Le signal 3 provient des différentes cytokines qui sont sécrétées par les CPA.

1.1.3.2.1 Signal 1 : L'interaction TCR-CMH-peptide

L'évènement central de la création d'une réponse immunitaire acquise est l'activation et l'expansion des cellules T suite à la reconnaissance du peptide spécifique à leur récepteur. L'interaction du TCR avec le peptide apprêté et présenté par le CMH d'une CPA donne alors

lieu au premier signal nécessaire à l'activation de la cellule T. La présentation antigénique via le CMHI ou le CMHII va induire une activation différentielle des deux types majeurs de lymphocytes T. En effet, le CMHI qui est exprimé par la majorité des cellules nucléées présente les peptides aux cellules T CD8⁺ (55). Quant à la molécule de CMHII, elle est majoritairement exprimée à la surface des CPA telles que les DC et permet la présentation des peptides aux cellules T CD4⁺ (55, 56).

Suite à la reconnaissance du complexe peptide-CMH par un TCR spécifique, les corécepteurs CD4 ou CD8 interagissent avec les CMHII ou CMHI respectivement pour augmenter la stabilisation de l'interaction TCR-peptide-CMH (57). La cellule T et la CPA subissent également une réorganisation de leur membrane qui aboutit à la formation d'une synapse immunologique (SI) (58, 59). En plus du TCR et du CMH, diverses molécules membranaires importantes pour l'activation telles que les molécules de costimulation et accessoires sont recrutées dans la SI et forment une large structure multimoléculaire appelée complexe d'activation supramoléculaire (SMAC). Le SMAC est composé d'une organisation structurelle centrale (cSMAC) qui consiste en un rassemblement de molécules de signalisation incluant des micros regroupements de TCR. Le cSMAC est entouré d'une structure périphérique (pSMAC) composée de molécules d'adhésion telle que LFA-1 (51, 60). L'organisation de la SI permet une disposition appropriée des différentes molécules, ainsi que la prolongation et l'augmentation de la force des interactions entre ces différentes molécules (59, 61). Suite à la formation de la SI, il y a phosphorylation du motif d'activation de récepteurs immun basé sur la tyrosine, « immunoreceptor tyrosine-based activation motifs » (ITAM) du complexe protéique CD3 (62). La phosphorylation des ITAM provoque le recrutement et l'activation de la protéine kinase ZAP-70, qui, à son tour phosphoryle d'autres protéines responsables de transmettre le signal reçu par le TCR, aboutissant ainsi au premier signal d'activation de la cellule T (62).

1.1.3.2.2 Signal 2 : Molécules de costimulation

La costimulation joue un rôle critique dans la régulation de la réponse immunitaire car, comme mentionné précédemment, lorsqu'une cellule T reçoit le signal 1 en l'absence d'un signal 2, elle devient anergique. Les molécules de cosignalisation font généralement partie de la

superfamille des immunoglobulines (IgSF) ou des facteurs ou récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TNF/TNFRSF) (63). Les molécules de costimulation les mieux caractérisées sont les molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) de la famille B7 qui sont membres de la IgSF et retrouvées majoritairement à la surface de CPA telles que les DC. Le CD86 est constitutivement exprimé par les CPA et son expression est rapidement augmentée suite à la perception d'un signal de danger reçu après la reconnaissance de pathogènes, tandis que l'expression de CD80 est plus tardivement augmentée (64, 65). CD80 et CD86 interagissent avec la molécule CD28 qui est une molécule de costimulation majeure, exprimée constitutivement par les cellules T naïves.

Lors de l'activation des cellules T, CD28 envoie une signalisation positive aux cellules T (60). En absence de ce signal médié par CD28, l'activation, la prolifération et la survie des cellules T sont réduites car cette signalisation via CD28 a diverses conséquences importantes qui aboutissent au soutien de ces différents stades par lesquelles passent les cellules T, permettant ainsi de leurs éviter la mort ou l'anergie cellulaire (66). En effet, CD28 agit en amplifiant directement la signalisation du TCR et en induisant une cascade de signalisation indépendante de celle du TCR au sein de la SI (66, 67). En fait, lors du processus d'activation, le CD28 est rapidement colocalisé avec les TCR au centre de la SI, qui est une zone dans laquelle on retrouve des micros regroupement de TCR au niveau du point de contact entre la cellule T et la CPA (68, 69) . La présence de CD28 dans la SI provoque différentes modifications biochimiques qui amplifient la signalisation du TCR. Par exemple, CD28 recrute et active la protéine kinase C, qui contribue à l'initiation et à l'amplification de l'activation des cellules T (68). La costimulation via CD28 est également critique pour la production d'interleukine (IL)-2, une cytokine importante pour la prolifération et la survie cellulaire (69, 70). En effet, CD28 s'associe avec la protéine kinase phosphoinositide 3 (PI3K) et active une voie de signalisation impliquant la protéine kinase B (AKT). La voie CD28-PI3K-AKT aboutit à l'augmentation de la transcription de l'ARN messenger de l'IL-2 (63). En plus, cette voie augmente la durée de vie de l'ARN messenger de l'IL-2 en induisant l'expression de protéines qui bloquent la dégradation de cet ARN, ce qui a pour conséquence d'augmenter la quantité de protéines synthétisées (69). L'activation de la voie PI3K-AKT par CD28 provoque également de nombreux changements métaboliques dans la cellule T. Par exemple, elle active le complexe mTOR, qui favorise la glycolyse aérobie ce qui soutient l'activation, la croissance et la différenciation cellulaire (71).

Le soutien de l'activation des cellules T peut également provenir d'une voie de signalisation de CD28 indépendante de celle du TCR. Cette voie de signalisation module l'apoptose des cellules T via l'inhibition de l'expression de CD95L et l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-XL par les cellules T (67, 69).

CD28 n'est pas la seule molécule de costimulation intervenant dans l'activation des cellules T. En effet, lorsque la cellule T naïve est activée, elle exprime d'autres molécules de costimulation qui viennent soutenir ou diversifier le signal induit par CD28. C'est le cas du costimulateur inductible des cellules T (ICOS), un autre membre de la famille des molécules CD28 et également celui de molécules appartenant à la TNF/TNFRSF, comme, par exemple, CD40L, OX40, 4-1BB et CD27. Les molécules de costimulation de la TNF/TNFRSF augmentent la prolifération, la production de cytokines et régulent l'expression des molécules anti-apoptotique via une voie de signalisation impliquant le recrutement de protéines adaptatrices associées au TNFR (TRAF) (63). Par exemple, la costimulation à travers 4-1BB, OX40 et CD27 induit le recrutement de protéines adaptatrices TRAF1, TRAF2 et TRAF3 qui vont être médiatrices d'une voie de signalisation favorisant la survie de la cellule T via l'augmentation de l'expression de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-XL (63). De plus, la costimulation via 4-1BB active AKT qui favorise la division cellulaire (63).

Les intermédiaires proximaux utilisés lors de la costimulation par les membres de la TNF/TNFRSF sont différents de ceux utilisés par les membres de la IgSF. Cependant, le but commun de cette costimulation est de soutenir les cellules T tout au long de leur activation, de leur fonction et de s'assurer qu'elles s'activent uniquement en cas de besoin. Par ailleurs, les signaux de costimulation fournis par certains membres de la TNF/TNFRSF influencent non seulement les cellules T mais également les CPA. Ces molécules agissent en induisant une signalisation bidirectionnelle, modulant ainsi l'activation et la fonction des CPA, mais aussi celle des cellules T via la transmission de signaux d'activation à la cellule T et aux CPA (72, 73). Par exemple, l'interaction de CD40, qui peut être exprimé par les DC, avec son ligand CD40L exprimé par les cellules T induit non seulement l'activation de gènes importants pour la fonction des DC, mais induit la production d'interféron gamma (IFN- γ) par les cellules T (73).

1.1.3.2.3 Signal 3 : Cytokines

En plus de recevoir le signal 1 et 2, la cellule T naïve doit recevoir un troisième signal provenant de cytokines afin de maintenir sa prolifération et de se différencier en cellule effectrice pleinement fonctionnelle. Lorsque la réponse immunitaire est mise en place, les CPA produisent des cytokines pro inflammatoires ayant un effet direct sur l'activation et l'expansion des cellules T. Ces cytokines lient leur récepteur présent à la surface des cellules T et activent une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant, par exemple, au remodelage de la chromatine afin de maintenir la transcription de différents gènes requis pour la prolifération et la survie (74). L'IL-1 est le médiateur du signal 3 pour les cellules T CD4+. En agissant directement sur les cellules T CD4+, elle augmente considérablement leur prolifération et leur différenciation (74, 75). L'IL-1 stimule également la production de l'IL-2 qui agira de manière autocrine sur les cellules T, principalement sur les CD4+ pour soutenir leur survie et leur prolifération (76). Le signal 3 est aussi important pour les cellules T CD8+ et il est fourni par l'IL-12 et les interférons α/β (IFN α/β) (74, 75). En absence de ces cytokines, la signalisation provenant du TCR et de la costimulation permettent d'initier la prolifération des cellules naïves, mais leur expansion clonale, leur fonction effectrice et leur survie est réduite (74). En fait, les cytokines vont agir comme un commutateur qui détermine si la signalisation TCR et la costimulation vont mener les cellules à une délétion clonale ou à une anergie en leur absence ou plutôt vers une réponse productive en leur présence.

Les cytokines jouent également un rôle primordial dans la différenciation des cellules T CD4+ en divers sous types de cellules effectrices ayant différentes fonctions. Ce sont, entre autres, les cellules T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, les cellules T helper folliculaire (T_{FH}) et les cellules T régulatrices induites (iTregs) (33, 36). La décision de se différencier en un sous type ou en un autre est influencée par le cocktail de cytokines (signal 3) sécrétées par les cellules du système immunitaire inné en réponse au pathogène qui a déclenché la réponse immunitaire. Ces cytokines stimulent des voies de signalisation intracellulaires qui activent des gènes spécifiques et conduisent à l'expression de facteurs de transcription spécifiques (Figure 2) (33, 36).

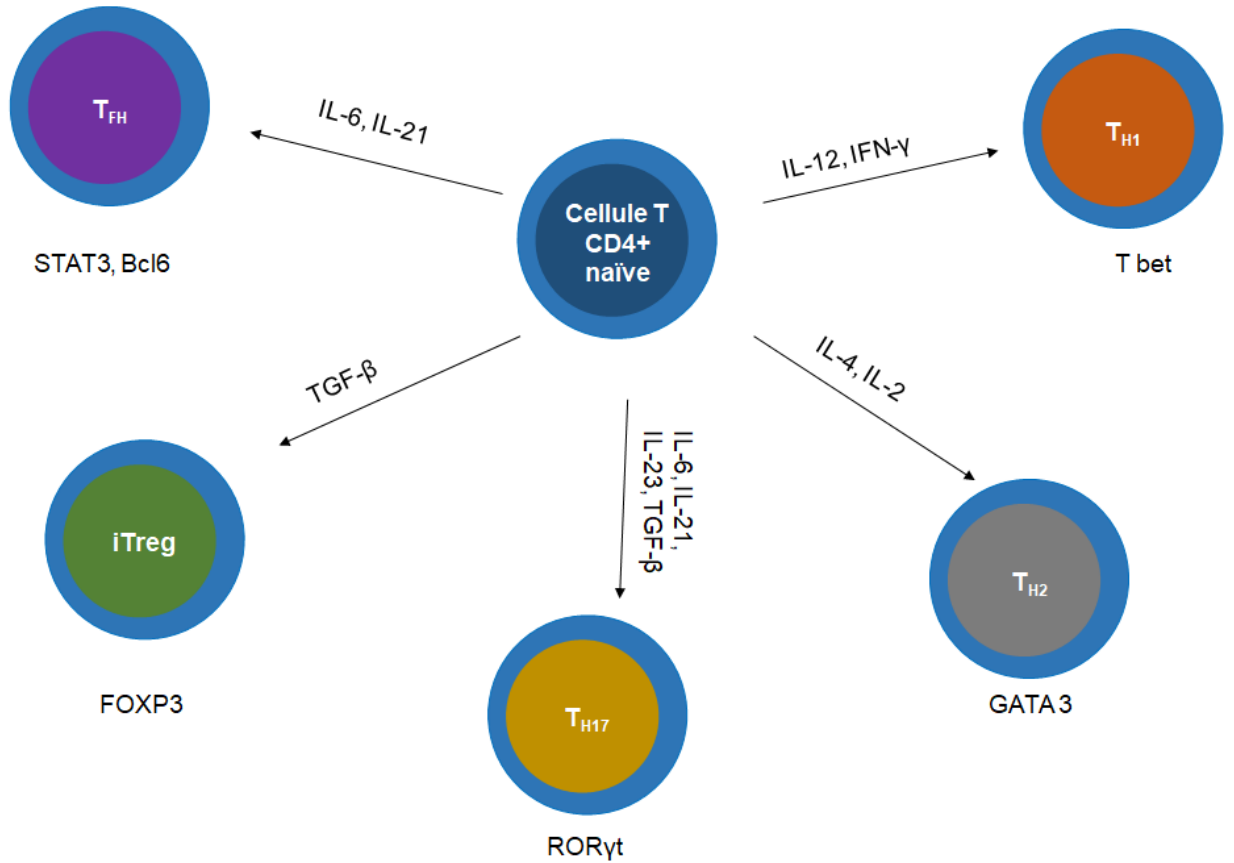


Figure 2. Impact du signal 3 sur la différenciation des cellules T CD4+. Les cellules T CD4+ naïves se différencient en différents sous types en fonction des cytokines présentes dans le milieu. Lorsque le signal 3 est composé d'IL-12 et d'IFN- γ , les cellules T CD4+ naïves se différencient en T_{H1}. Par contre, l'IL-4 et 2 sont critiques pour la différenciation en T_{H2}, l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et le TGF- β pour la différenciation en T_{H17}, tandis que le TGF- β seul induit la différenciation en iTreg et la combinaison d'IL-6 et d'IL-21 conduisent vers une différenciation des CD4+ en T_{FH}. Différents facteurs de transcription tel que T-bet, GATA3, ROR γ t, FOXP3, STAT3 et Bcl6 sont activés par les cytokines et gouvernent la différenciation des T CD4+ naïfs en un sous type ou en un autre.

1.2 Les mécanismes de contrôle de la réponse immunitaire

1.2.1 Les molécules de coinhibition

Une fois que les cellules T ont reçu les 3 signaux, elles s'activent complètement, prolifèrent et deviennent fonctionnelles. Cependant, afin de préserver l'homéostasie, il est important qu'un contrôle soit exercé sur leur activation, leur prolifération et leur fonction (77). Pour cela, il existe des «freins immunologiques» constitués par des récepteurs de coinhibition dont l'expression est généralement induite sur les cellules T activées (77). Même si les molécules de coinhibition les mieux caractérisées sont CTLA-4, qui se lie au CD80 et au CD86, et PD-1, qui se lie au PD-L1 et au PD-L2, il existe plusieurs autres molécules de coinhibition importantes telles que BTLA, CD160, TIM-3 ou encore LAG-3 (63).

CTLA-4 est constitutivement exprimé dans des vésicules intracellulaires au niveau des cellules T non activées. Son expression est rapidement augmentée à la surface de la cellule T, via un mécanisme d'exocytose qui prend place lorsque la cellule T a reçu des signaux de stimulation provenant du TCR et de CD28 (63, 78). Tout comme CTLA-4, PD-1 n'est pas exprimé par les cellules T au repos, mais son expression est induite après qu'elles aient reçu une signalisation TCR (79). PD-L1, un des ligands de PD-1 est constitutivement exprimé par les CPA, mais son expression peut également être augmentée sur ces cellules et peut être induite sur une variété de cellules non hématopoïétiques en cas d'inflammation (80-82). Quant à PD-L2, son expression est induite principalement sur les DC (80, 81).

1.2.2 Les mécanismes de coinhibition

Afin de contrôler la réponse des cellules T, les récepteurs de coinhibition agissent via différents mécanismes (83). Un des mécanismes utilisés consiste à entrer en compétition avec les molécules de costimulation pour se lier à leur ligand, ce qui a comme conséquence de prévenir le signal activateur de la costimulation. Un autre mécanisme utilisé par les molécules de coinhibition consiste à interférer avec les molécules activatrices et à atténuer leur signalisation intracellulaire positive (83). En effet, plusieurs molécules de coinhibition atténuent

non seulement la signalisation du TCR, mais également celle des molécules de costimulation, résultant ainsi en une réduction quantitative dans la transduction du signal d'activation et qualitative au niveau de la survie, la prolifération et le métabolisme cellulaire (83). En outre, les molécules de coinhibition sont également capables d'augmenter l'expression de gènes impliqués dans le dysfonctionnement des cellules T.

Un des mécanismes utilisés par CTLA-4 pour inhiber l'activation des cellules T est d'entrer en compétition avec CD28 pour se lier au CD80/CD86. Lorsque son expression est augmentée suite à l'activation des cellules T, CTLA-4 forme des micros regroupements qui s'accumulent au centre de la SI au même endroit que les micros regroupement de CD28 et du TCR (60). Comme l'affinité de CTLA-4 pour CD80/CD86 est plus forte que celle de CD28, sa présence dans la SI provoque l'interruption de l'interaction de CD28 avec CD80/CD86. Cependant, l'effet inhibiteur de CTLA-4 sur la fonction des cellules T ne s'explique pas uniquement par le fait qu'il interrompt la liaison de CD28 avec CD80/CD86, car CTLA-4 est aussi capable de transmettre des signaux inhibiteurs aux cellules T (84, 85). En effet, lorsque les cellules T sont traitées avec des anticorps agonistes de CTLA-4, leur prolifération est inhibée, ce qui implique qu'il y a une signalisation induite par CTLA-4 qui interfère avec la signalisation du TCR et du CD28 (78, 84). CTLA-4 est également responsable d'une inhibition directe au niveau de la SI en provoquant la déphosphorylation des molécules impliquées dans la voie de signalisation du TCR suite à l'activation de phosphatases intracellulaires (78, 84, 85). De plus, CTLA-4 induit des signaux qui augmentent la mobilité des cellules T, diminuant ainsi leur capacité et leur temps de contact avec les CPA (78, 84). Par ailleurs, il existe une signalisation bidirectionnelle de CTLA-4 dans les cellules T et les CPA. Cette signalisation induit l'expression d'une enzyme appelée indoleamine-1,3-dioxygénase (IDO), qui catabolise le tryptophane, un acide aminé important pour la prolifération des cellules T et dont la déplétion inhibe celle-ci (86).

L'interaction de PD-1 avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 régule également la fonction des cellules T. L'expression de PD-1 agit d'une part en augmentant l'expression de gènes responsable de neutraliser la fonction des cellules T. Par exemple, la voie de signalisation de PD-1 induit l'expression du facteur de transcription BATF, qui est responsable de la réduction de la prolifération et de la sécrétion d'IL-2 (83, 85). D'autre part, suite à son interaction avec PD-L1, PD-1 se localise avec des micros regroupements de CD28 et recrute des phosphatases

pour déphosphoryler CD28 (87). PD-L1 interagit également avec CD80 pour inhiber la fonction des cellules T activées (88). Certains des mécanismes utilisés par PD-1 pour inhiber la fonction des cellules T sont similaires à ceux utilisés par CTLA-4 (81, 85). Par contre, PD-1 semble avoir un effet plus étendu que CTLA-4, car il inhibe 90% des gènes dont l'expression est augmentée suite à la stimulation des cellules T, tandis que CTLA-4 inhibe environ 70% de ces gènes (89). De plus, PD-1 inhibe fortement la survie des cellules T en réprimant l'expression du gène de survie Bcl-XL (89).

Par ailleurs, il existe une différence d'expression temporelle de PD-1 par rapport à CTLA-4 (90). En effet, même si ces deux molécules peuvent être coexprimées, PD-1 est plus tardivement exprimé à la surface des cellules T activées (90-94). En plus de cela, l'expression de PD-L1 est ubiquitaire par rapport à celle de CD80 et CD86 qui est principalement restreinte aux CPA (95). Ceci fait de PD-1 et de ses ligands des acteurs intervenant principalement plus tard dans l'activation des cellules T. PD-1 joue donc un rôle majeur au moment de la phase effectrice, pour réguler la réponse immunitaire dans les tissus périphériques, tandis que CTLA-4 intervient principalement au début de l'activation (78, 81, 85, 96).

1.3 Implication des molécules de cosignalisation dans les maladies auto-immunes et le cancer

1.3.1 Implication des molécules de cosignalisation dans la prévention des maladies auto-immunes

Le système immunitaire est finement régulé par divers mécanismes afin d'assurer une réponse immunitaire appropriée contre les pathogènes et les cellules tumorales tout en préservant une tolérance immunologique caractérisée par l'absence de réponse immunitaire contre les antigènes du soi. Les mécanismes de tolérance sont classés en deux catégories qui sont la tolérance centrale et la tolérance périphérique. Les thymocytes ayant réarrangé avec succès les chaînes α et β de leur TCR interagissent avec différents peptides du soi présentés via le CMH des cTECs, mTECs et DC thymiques. Les thymocytes interagissant trop fortement avec le complexe peptide du soi-CMH sont supprimés par un processus de sélection négative. En réalité, la sélection négative est un des principaux types de tolérance centrale qui assure

l'élimination d'une partie des cellules T auto-réactives (47). En fait, les mTEC et DC thymiques expriment les facteurs de transcription AIRE et FEZF2, qui sont des régulateurs de l'auto-immunité, jouant un rôle essentiel dans la tolérance immunitaire en gouvernant l'expression ectopique d'antigènes spécifiques aux tissus périphériques (TSA) (97, 98). Les thymocytes interagissent également avec les DC du cortex qui leur présentent des antigènes ubiquitaires du soi. Comme mentionné précédemment, si l'interaction du TCR des thymocytes avec un peptide du soi est de trop grande affinité, ces thymocytes sont considérés comme auto-réactifs; certains sont éliminés par sélection négative et d'autres peuvent être convertis en cellules tolérogènes telles que les Treg (47). Cependant, ce ne sont pas tous les antigènes du soi qui sont présentés aux thymocytes au niveau du thymus et le processus de tolérance centrale n'est pas parfait (99). De ce fait, certaines cellules auto-réactives se retrouvent en périphérie (99). Pour éviter que celles-ci s'activent et s'attaquent au soi, il existe une tolérance périphérique permettant de contrôler ces cellules T auto-réactives qui ont échappé à la sélection négative (99).

Différents mécanismes de tolérance périphérique existent et impliquent, entre-autres, les molécules de cosignalisation (99). Tout d'abord, la nécessité d'avoir un signal de costimulation suite au signal du TCR pour pouvoir activer les cellules T ainsi que l'anergie qui résulte de l'absence de signal de costimulation est un mécanisme de tolérance périphérique. Étant donné que des peptides sont continuellement présentés aux cellules T en périphérie, ce mécanisme permet d'éviter l'activation de cellule T dont le TCR reconnaîtrait un peptide du soi en absence d'inflammation. Par ailleurs, en situation d'inflammation, lorsqu'une cellule T reçoit tous les signaux nécessaires à son activation, une costimulation excessive et/ou une coinhibition déficiente peut conduire à une réduction de la tolérance, induisant ainsi l'auto-immunité (100). Plusieurs molécules de costimulation comme ICOS ou CD40L et celles de coinhibition comme CTLA-4 et PD-1 sont impliquées dans la pathogénèse de maladies auto-immunes.

L'importance du rôle des molécules CTLA-4, PD-1 et PD-L1 dans le maintien de la tolérance périphérique a été démontré dans différents modèles de souris. En effet, les souris déficientes en CTLA-4 et en cellules Treg, qui sont reconnues pour exprimer constitutivement CTLA-4, développent en l'espace de quelques semaines une auto-immunité spontanée caractérisée par l'infiltration massive de cellules T dans les tissus normaux (101, 102). De plus, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 antagonistes chez des souris normales induit l'activation de cellules T auto-réactives (103-105). Des effets similaires, mais moins

sévères sont aussi observés chez les humains recevant des anticorps thérapeutiques anti-CTLA-4. En outre, chez l'humain, des pathologies impliquant des défauts au niveau de CTLA-4 démontrent l'importance de cette molécule dans la tolérance immunitaire. L'une de ces pathologies est le syndrome lymphoprolifératif auto-immun dû à une haploinsuffisance de CTLA-4 résultant de mutations dans le gène codant pour le CTLA-4 (106). Ces mutations conduisent soit à la synthèse de CTLA-4 soluble, soit à la synthèse de CTLA-4 incapable de se lier à ses ligands. D'autres pathologies liées au CTLA-4 sont une combinaison de syndromes d'auto-immunité, de lymphoprolifération et une immunité humorale déficitaire causés par une mutation de LRBA, une molécule responsable du recyclage et du transport de CTLA-4 à la surface des cellules (106, 107). Ces deux pathologies caractérisées par l'absence de CTLA-4 ou la diminution de son expression extracellulaire peuvent se traduire au niveau clinique par une splénomégalie et une infiltration de lymphocytes dans des organes non lymphoïdes (106, 107). Tout ceci confirme le rôle majeur de CTLA-4 dans le maintien de la tolérance par l'exercice d'un contrôle négatif de la réponse des cellules T vis-à-vis des antigènes du soi.

Quant à PD-1, il a été montré que les souris déficientes en PD-1 développent aussi une auto-immunité spontanée mais sur un plus long terme. Les souris déficientes pour PD-L1, quant à elles, ne développent pas d'auto-immunité spontanée mais sont plutôt susceptibles de la développer. En effet, lorsque des cellules T portant un TCR spécifique à un antigène sont transférées dans des souris déficientes en PD-L1 ou de type sauvage (WT) et sont ensuite stimulées avec l'antigène auquel elles sont spécifiques, les souris PD-L1 déficientes développent une réaction immunitaire sévère comparativement au WT (108). Tout ceci montre que le rôle majeur de l'axe PD-1/PD-L1 est d'induire un rétrocontrôle négatif au niveau de l'activation des cellules T dans des situations d'inflammation (108). Ainsi, les molécules de coinhibition sont qualifiées de point de contrôle qui jouent un rôle crucial dans la tolérance périphérique en limitant la réponse des cellules T et en prévenant l'activation des cellules T potentiellement auto-réactives.

1.3.2 Implication des molécules de cosignalisation dans l'évasion tumorale

Le développement du cancer se fait en trois phases durant lesquels les cellules immunitaires et tumorales interagissent continuellement. Ce sont les phases d'élimination, d'équilibre et d'évasion (109). Durant la phase d'immunosurveillance ou d'élimination, les cellules cancéreuses, qui sont efficacement reconnues et éliminées par le système immunitaire sont cliniquement indétectables du fait qu'elles n'arrivent pas à se développer (109, 110). Dans la phase d'équilibre, les cellules tumorales sont maintenues en dormance (110, 111). Au cours de cette phase, à cause de leur instabilité génétique, de leur division cellulaire anarchique et de la pression immunitaire à laquelle les cellules cancéreuses sont constamment soumises, certaines d'entre elles deviennent moins immunogéniques et résistantes au contrôle du système immunitaire (110, 111). Ceci aboutit à la phase d'évasion (110, 111). C'est une phase durant laquelle la prolifération des cellules tumorales les plus agressives ne peut plus être restreinte par le système immunitaire (110, 111). Ces cellules tumorales deviennent alors cliniquement détectables (110, 111). Pendant cette phase, les cellules cancéreuses mettent en place différentes stratégies qui leur permettent d'échapper au contrôle du système immunitaire en atténuant ou en inhibant l'action des cellules anti tumorales effectrices (110, 111). Ainsi, même si l'organisme est immunocompétent et que la tumeur présente des antigènes pouvant être reconnus par les cellules immunitaires, il n'y a pas ou très peu de réponse immunitaire. Pour arriver à se maintenir dans un système immunocompétent, la tumeur doit créer un microenvironnement tumoral (TME) qui diminue l'efficacité des cellules immunitaires tumoricides, c'est-à-dire un microenvironnement immunosuppressif. Un des mécanismes majeurs mis en place par les cellules tumorales pour parvenir à échapper au système immunitaire est la réduction de l'expression des composantes responsables de l'apprêtement et de la présentation des antigènes. Par exemple, plusieurs cellules cancéreuses réduisent l'expression de leurs molécules du CMH (109, 112). L'immunosuppression médiée par les cellules Treg et d'autres cellules immunosuppressives, telles que les cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde (MDSC) ou les macrophages associés à la tumeur dans le TME, apparaît être un autre mécanisme important impliqué dans l'évasion tumorale (109, 110, 112). Ces cellules sont généralement générées *in situ* ou recrutées par différents facteurs sécrétés par la tumeur et d'autres cellules présentes dans le TME (109, 110, 112). Par exemple, la tumeur sécrète le

facteur de transformation beta (TGF- β), qui provoque la conversion des cellules T CD4⁺ en Treg, tandis que d'autres facteurs sécrétés par les MDSC attirent les macrophages qui vont, comme les MDSC, supprimer l'activité des cellules T et des DC via la sécrétion de différentes cytokines et enzymes (110, 113). Une autre stratégie majeure d'évasion est l'augmentation de l'expression des molécules de coinhibition, qui sont responsables de la réduction de l'activité des lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL) (109, 110, 112).

Les molécules de coinhibition sont des points de contrôles qui sont impliqués dans la régulation des réponses immunitaires. Ils sont essentiels pour l'établissement d'un équilibre avec les molécules de costimulation afin de moduler la durée et l'intensité de la réponse immunitaire. Cependant, les cellules tumorales peuvent également prendre avantage de l'expression de ces points de contrôle pour échapper au système immunitaire en inhibant les TIL. Par exemple, l'expression de CTLA-4 par les TIL et les Treg joue un rôle important dans la progression des tumeurs via des mécanismes qui vont inhiber la fonction des cellules T effectrices mais aussi des DC. En effet, comme il a déjà été mentionné, l'expression de CTLA-4 par les cellules T effectrices inhibe leur fonction. Par contre, l'expression de CTLA-4 par les Treg va principalement altérer l'activation et la fonction des DC, ce qui aura un impact sur la prolifération des TIL, la progression de leur cycle cellulaire et leur production d'IL-2 (114, 115).

Un grand nombre de cancers comme le mélanome, le myélome multiple ainsi que le cancer du sein et rénal augmentent leur expression de PD-L1 via de multiples voies de signalisation oncogéniques, mais également suite à leur exposition à différentes cytokines inflammatoires produites par les cellules immunitaires infiltrant la tumeur, comme l'IFN- γ (82, 116). L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales leur permet d'exploiter la fonction inhibitrice de PD-1 qui est fortement exprimé par les TIL (82, 116). En effet, l'interaction de PD-L1 avec le PD-1 va induire l'épuisement, l'anergie ou la mort des TIL, affaiblissant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale et augmentant la croissance de la tumeur (112, 117). De plus, PD-L1 n'interagit pas uniquement avec PD-1, mais inhibe la fonction des cellules T en interagissant également avec la molécule CD80 qui peut être exprimée par les cellules T activées (116, 118). Il a aussi été démontré que l'épuisement des TIL dans la tumeur est induit par la surexpression de PD-L1 par les macrophages associés à la tumeur, les DC et les MDSC (119). En plus d'inhiber directement la fonction des cellules T, PD-L1 peut induire la conversion de cellule T en Treg (120). L'expression de la molécule de coinhibition PD-L1 est donc associée

avec une tumeur plus agressive, un pronostic défavorable et un risque élevé de mortalité dans certains cancers (82, 114, 121). En plus de PD-L1, la molécule PD-L2, exprimée par certains types de lymphomes de cellules B et dans le TME par les CPA et les fibroblastes associés à la tumeur, contribue également à l'immunosuppression en interagissant avec PD-1 (82, 114). Il est important de noter que CTLA-4, PD-L1, PD-L2 et PD-1 ne sont pas les seules molécules de coinhibition participant à l'évasion tumorale. Il existe en effet une très grande diversité de ces molécules impliquées dans la résistance des cellules tumorales aux attaques du système immunitaire. Parmi celles-ci, on peut citer par exemple LAG-3, exprimée par les cellules T, et B7-H4, ayant un ligand inconnu et dont l'expression par les cellules tumorales est associée avec une progression de la tumeur (114, 122-124).

1.3.3 L'immunothérapie anti-cancer ciblant les molécules de cosignalisation

L'importance des molécules de coinhibition dans la régulation de la fonction des cellules T fait de ces points de contrôle des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, lors de l'activation des cellules T, l'augmentation de l'expression des molécules de coinhibition est temporaire pour permettre de contrôler cette dernière et de mettre fin à la réponse immunitaire afin d'éviter l'auto-immunité. Cependant, dans le contexte d'un cancer, ces molécules sont soit exprimées par les cellules tumorales soit constamment surexprimées par les TIL (77). Elles sont ainsi responsables de l'épuisement et du dysfonctionnement des cellules T, et tel que discuté précédemment, de l'évasion tumorale. Des stratégies ont donc été développées pour rendre les cellules cancéreuses vulnérables à l'attaque du système immunitaire. Une de ses stratégies consiste à neutraliser les mécanismes inhibiteurs présents dans le TME en réduisant l'activité immunosuppressive des molécules de coinhibition. C'est l'immunothérapie anti-cancer utilisant des anticorps bloquant les points de contrôles (77).

L'ipilimumab et le tremelimumab sont les premiers anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 bloquants à avoir été développés et testés cliniquement (125). Cependant, seul l'ipilimumab a reçu l'approbation de l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA), car son utilisation a permis d'augmenter le taux de survie globale des patients comparativement au tremelimumab (125). L'anticorps anti-CTLA-4 permet d'activer

la réponse immunitaire anti-tumorale, mais son mécanisme primaire d'action n'est pas bien connu. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet de l'anti-CTLA-4. Des études suggèrent que le blocage de CTLA-4 promeut l'activation et la prolifération de cellules T de spécificité antigénique variée (78, 125, 126). Au sein de la tumeur, l'anti-CTLA-4 agit préférentiellement sur les cellules Treg, qui expriment de haut niveau de CTLA-4 comparativement aux cellules T effectrices (Teff), et induit leur déplétion ou l'altération de leur activité immunosuppressive (78, 125, 126). Cet effet de l'anti-CTLA-4 sur les Treg conduit à une augmentation du ratio Teff/Treg et restaure ainsi la réponse anti-tumorale (126, 127). Une étude clinique a aussi montré que l'anti-CTLA-4 diversifie le réservoir de cellules T au niveau périphérique (128). Par ailleurs, cet anticorps augmente spécifiquement l'expansion des cellules Th1 ICOS+ et celle des cellules T CD8+ épuisées, qui sont deux types cellulaires jouant un rôle important dans l'immunité anti-tumorale (129). De plus, l'anticorps anti-CTLA-4 empêche la signalisation de CTLA-4 responsable de la production de l'enzyme IDO par les CPA, permettant ainsi de rétablir les niveaux de tryptophane nécessaires à la prolifération des cellules T (125, 126).

Suite au développement des anticorps anti-CTLA-4, des anticorps ciblant l'axe PD-1/PD-L1 ont été développés (78, 125). Présentement, deux thérapies anti-PD-1, le pembrolizumab et le nivolumab et une thérapie anti-PD-L1, l'atezoluzimab ont été approuvées par la FDA et sont utilisées pour le traitement du mélanome, du cancer du poumon et du cancer de la vessie (78, 96, 130). Tout comme les anticorps anti-CTLA-4, l'utilisation des anticorps anti-PD-1 ou -PD-L1 lève l'inhibition des cellules T et restaure l'immunité anti-tumorale en stimulant principalement l'expansion des TIL CD8+ épuisés (129). Cependant, les thérapies anti-PD-1/PD-L1 et anti-CTLA-4 ont des effets secondaires associés au système immunitaire qui sont différents au niveau de leur sévérité et de leur incidence (108, 131). Le traitement anti-CTLA-4 induit chez l'humain une infiltration massive de cellules T dans les tissus tumoraux, mais également dans les tissus normaux, ce qui fait que son efficacité est étroitement associée avec sa toxicité auto-immunitaire (108, 131). Par contre, la thérapie anti-PD-1/PD-L1 module principalement la réponse immunitaire au site même de la tumeur, qui est particulièrement enrichie en PD-L1 et PD-1 (108, 131). Grâce à ce mode d'action localisé, les anti-PD-1/PD-L1 rétablissent la réponse immunitaire intra-tumorale déjà en place, mais qui était cependant défectueuse à cause de l'expression élevée de PD-L1, induisant ainsi des effets cytotoxiques

dont l'incidence et le grade sont moindres comparativement à l'anti-CTLA-4 (108, 131). Des études montrent que deux fois moins de patients traités avec des anti-PD-1 (10-15%) développent des effets immunitaires délétères de gravités importantes en comparaison à ceux traités avec les anti-CTLA-4 (20-30%) (131, 132). Par ailleurs, l'anti-PD-1 restaure la fonction des cellules Teff en périphérie, épuisées suite à leur exposition chronique aux antigènes tumoraux (78, 133). Mais, contrairement à l'anti-PD-1, l'anti-PD-L1 cible plus spécifiquement les tumeurs et les autres cellules PD-L1+ et bloque l'interaction PD-L1/PD-1, tandis que l'interaction PD-L2/PD-1 n'est pas affectée (78, 133). De ce fait, l'auto-immunité qui se développe suite à ce traitement pourrait être potentiellement contrôlée par l'interaction PD-L2/PD-1 (133).

Les immunothérapies anti-tumorales et, en particulier, les anticorps monoclonaux bloquant l'interaction des molécules de coinhibition PD-1/PD-L1 et CTLA-4 ont eu un impact positif sur le traitement des patients atteints de cancer. Effectivement, avant le développement de l'anti-CTLA-4, les patients atteints de mélanome de stade IV avaient une survie globale médiane allant de 8 à 10 mois lorsqu'ils étaient traités avec les thérapies traditionnelles et, parmi les personnes traitées, 10% avaient une espérance de vie de 5 ans (134). Donc, très peu de patients bénéficiaient des effets thérapeutiques de ces traitements (134). L'utilisation de l'anticorps anti-CTLA-4 a permis d'atteindre une médiane de survie globale de 11,4 mois avec environ 20% des patients ayant au moins 3 ans de survie et parmi lesquels certains atteignaient 10 ans (134, 135). Les résultats encourageant obtenus avec l'anti-CTLA-4 auprès de patients atteints de certains cancers ont démontré que le blocage des points de contrôle impliqués dans la régulation de l'activité des cellules T représentait un moyen efficace pour augmenter le taux de survie des personnes atteintes de certains cancers (134, 136, 137). En plus, le taux de survie des patients atteints de mélanome qui ne répondaient pas aux monothérapies a augmenté lorsqu'ils étaient traités avec une combinaison d'anti-CTLA-4 et d'anti-PD-1. Cependant, les effets secondaires résultants de la combinaison de ces thérapies étaient aussi amplifiés (138, 139).

Par ailleurs, malgré le succès clinique de ces thérapies lorsqu'elles sont utilisées en monothérapie ou en combinaison, leur efficacité varie en fonction des patients ayant le même type de tumeur et en fonction du type de tumeur (96, 140). Cette variabilité, mais également la persistance de certains effets immunitaires délétères après le traitement, montrent l'importance

de l'identification et du ciblage de biomarqueurs ou d'autres molécules de coinhibition exprimés par les cellules tumorales ou les cellules immunitaires, ce qui permettrait de prédire l'efficacité d'un traitement (141-143). À ce propos, des études cliniques sont déjà en cours pour déterminer l'efficacité du blocage et de la combinaison avec les thérapies existantes d'autres molécules de coinhibition telles que TIM-3 et LAG-3, qui sont souvent exprimées par les cellules T présentes dans le TME (144, 145). D'autres molécules de coinhibition, telles que B7-H4 exprimées par les cellules cancéreuses font également l'objet d'intérêt comme cibles thérapeutiques (146). Par rapport aux biomarqueurs, la forte expression de PD-L1 par les tumeurs avait été considérée comme un biomarqueur associé au succès des anticorps ciblant l'axe PD-1/PD-L1 (147). Cependant, plusieurs études ont montré des résultats contradictoires où, dans certains cancers, la surexpression de PD-L1 était associée à une meilleure efficacité des anti-PD-1/PD-L1 tandis que dans d'autres cas, les patients avec des cancers surexprimant le PD-L1 ne bénéficiaient pas des effets des anticorps (147, 148). Ces résultats contradictoires indiquent ainsi qu'à partir de l'expression d'une seule molécule, il est difficile de prédire l'efficacité des anticorps bloquant (147, 148). Ils suggèrent également que plusieurs autres facteurs, y compris l'expression d'autres molécules de cosignalisation, peuvent influencer l'effet de ces traitements (147, 148). Des molécules appartenant à la IgSF ou à la TNFRSF dont quelques-unes sont exprimées par certaines tumeurs ont encore des rôles et/ou des partenaires d'interaction inconnus (149). Ainsi, la caractérisation de ces cibles thérapeutiques potentielles représentent une étape importante pour le développement de nouvelles thérapies ou l'amélioration de la réponse à des thérapies déjà existantes (149).

1.4 CD271

CD271, aussi connu sous les appellations du récepteur de facteur de croissance neuronale (NGFR), p75NTR ou TNFRSF16, est une glycoprotéine membranaire, membre de la superfamille des TNFR dont la portion extracellulaire est composée de quatre domaines riches en cystéine (150). Il est exprimé par divers cellules et tissus neuronaux et interagit avec tous les membres de la famille des neurotrophines soit, le facteur de croissance neuronal (NGF), les neurotrophines 3 et 4 et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (151). Son

interaction avec les différentes neurotrophines lui permet de jouer un rôle important dans la différenciation, la fonction et la survie des cellules du système nerveux (152-154).

1.4.1 Expression et fonction de CD271 dans le système immunitaire

Plusieurs études ont montré que le système nerveux et le système immunitaire communiquaient ensemble. En effet, certaines cellules du système immunitaire, par exemple les monocytes et les macrophages, qui secrètent des neurotrophines comme les BDNF ou des neurotransmetteurs comme la norépinephrine ou les catécholamines, peuvent influencer le fonctionnement du système nerveux (155). Inversement, le système nerveux peut moduler la fonction du système immunitaire via certains récepteurs de neurotransmetteurs ou de neurotrophines qui sont exprimés par certaines cellules immunitaires (155). En particulier, CD271 mais également un autre récepteur de NGF, le récepteur tyrosine kinase A (TrkA), sont exprimés par plusieurs types de cellules immunitaires et peuvent affecter leur survie, leur prolifération et leur fonction (156). Par exemple, CD271 est exprimé dans le thymus par les cellules épithéliales et dendritiques médullaires, où il serait impliqué dans le développement des thymocytes, mais son rôle précis reste encore à être caractérisé (157-159). Les monocytes, lymphocytes T et B activés, les éosinophiles et mastocytes produisent du NGF et expriment soit un ou deux de ses récepteurs, permettant ainsi le contrôle de leur fonction par le NGF (156-158). C'est le cas de la prolifération des cellules T, qui expriment uniquement le récepteur TrkA qui est modulé de manière autocrine par le NGF (160).

L'expression de CD271 a également été observée sur les DC de la rate et des nodules lymphatiques (156, 158). Une étude s'intéressant au rôle de CD271 sur les DC humains a montré que son interaction avec NGF participait à la maturation des DC (161). Cette interaction induisait, par exemple, l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 ou la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α , augmentant ainsi la capacité des DC à stimuler les cellules T (161). Au niveau des DC murines, cette interaction augmentait aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ce qui indiquait un rôle pour CD271 dans la régulation immunitaire (156).

D'autres cellules impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire expriment également CD271. En effet, de façon intéressante, CD271 est aussi exprimé par des cellules ayant des fonctions immunosuppressives telles que les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) et les MDSC (162-164). Par contre, le rôle de CD271 sur ces cellules n'est pas connu. Par ailleurs, l'expression de CD271 est également augmentée par certains cancers comme le mélanome, le cancer du sein et le cancer gastrique, entre autres, au niveau desquels son expression est associée à un mauvais pronostic (165, 166). De plus, CD271 est un marqueur potentiel de cellules souches cancéreuses et est requis pour la tumorigénicité de certaines tumeurs, comme le mélanome et le cancer de l'œsophage (167, 168). La résistance de ces cancers n'est pas nécessairement associée à la régulation de la réponse immunitaire mais peut être due à la signalisation NGF/CD271, qui peut induire l'augmentation des signaux de survie et la prolifération de certaines cellules cancéreuses (169). Cependant, dans le cas du mélanome, une étude a montré que CD271 est un facteur immunosuppresseur dont l'expression est augmentée sur les cellules tumorales par l'IFN- γ , une cytokine qui est également responsable de l'augmentation de l'expression de PD-L1 (166). Cette étude indiquait que l'augmentation de l'expression de CD271 contribuait à l'évasion tumorale en provoquant une baisse de l'expression des antigènes tumoraux de surface (166).

CD271 semble également être impliqué dans le contrôle de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), une maladie induite chez la souris qui mime la sclérose en plaques multiple, une maladie auto-immune humaine au cours de laquelle les gaines de myéline sont détruites. Une étude a en effet montré que des souris déficientes pour CD271 développaient une EAE plus sévère ou létale comparativement aux souris WT dû à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins cérébraux et à une infiltration plus massive de cellules T au niveau du cerveau (170). Cette étude suggérait ainsi un rôle de CD271 dans la protection contre la sévérité de l'EAE sans toutefois considérer la possibilité que CD271 puisse être un régulateur de l'activation et de la fonction des cellules T.

1.5 Rationnelle, hypothèse et objectifs spécifiques

CD271 est exprimé par les cellules immunitaires comme les DC, par des cellules immunomodulatrices et par des cellules cancéreuses. De plus, de nombreuses molécules de la TNFRSF sont impliquées dans la régulation de la fonction des cellules T via des interactions directes, ce qui implique que CD271 pourrait interagir directement avec les cellules T pour moduler leur activité. Dans le cas particulier de l'EAE, différents mécanismes ont permis d'expliquer la sévérité de la maladie chez les souris CD271 déficientes comparativement aux souris WT. Cependant, une modulation directe de la réponse immunitaire en générale et de celle des cellules T en particulier n'a pas été prise en compte mais pourrait éventuellement être considérée comme mécanisme possible d'immunorégulation par CD271 dans le contrôle de l'EAE. Ce qui appuierait l'existence d'une interaction directe entre le CD271 et les cellules T. En plus de cela, une étude utilisant la technique de micropuce à protéines et des protéines recombinantes couplées à des billes a permis d'identifier de nouvelles interactions entre protéines (171). Parmi ces interactions, une interaction potentielle entre le CD271 et le CD80 humain a été détectée. Or, CD80 est une molécule de costimulation importante, exprimée principalement par les CPA, mais également par les cellules T activées dont la fonction peut être inhibée par l'interaction entre CD80 et PD-L1 (118). Ceci suggère que l'interaction entre CD271 et CD80 pourrait également avoir des effets importants sur la réponse immunitaire (171). De ce fait, nous avons posé l'hypothèse que « **CD271 peut moduler directement l'activité des cellules T en interagissant avec les cellules T** ». Les objectifs principaux de ces travaux de recherche étaient de :

- 1- Caractériser l'interaction de CD271 et avec les membres de la famille B7
- 2- Déterminer les effets de CD271 sur la fonction des cellules T

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Réactifs et milieux

Le « Roswell Park Memorial Institute medium » (RPMI)-1640, le « Minimal Essential Medium α » (α MEM), le « Dulbecco's Modified Eagle's Medium » (DMEM), la pénicilline/streptomycine (P/S), le L-glutamine (L-glut), la trypsine, le bleu de trypan et le sérum bovin foetal (FBS) ont été achetés chez Wisent. Le Ficoll-Paque™ PLUS provient de chez GE Healthcare. Le marqueur de viabilité Zombie-Aqua provient de chez BioLegend. Les anticorps de grade fonctionnel anti-CD3 humain (anti-hCD3) et anti-hCD28, les anticorps conjugués anti-hCD3-Pacific blue, anti-hCD4-APC/Cy7, anti-hCD8 α -PE/Cy7, anti-hCD69-APC, anti-hCD80-biotin, anti-hCD86-Pacific blue, anti-hCD271-APC clone ME20.4, anti-hIFN- γ -FITC et anti-hTNF- α -PE, ainsi que les anticorps anti-CD3 murin (anti-mCD3) et anti-mCD28 de grade fonctionnel, les anticorps anti-mTCR β -PE, anti-mCD4-PE/Cy7, anti-mCD8 α -Pacific Blue, anti-mCD69-PerCP/Cy5.5 et anti-mCD80-biotin proviennent également de chez BioLegend. L'anticorps anti-hIgG1-Alexa fluor 488 provient de chez Life Technologies. L'anticorps anti-hIL-2-APC et la streptavidine-PE de chez eBioscience ont été utilisés. L'anticorps anti-h/mCD271-FITC clone MLR2 de chez Abcam a été utilisé. Les protéines recombinantes (Fc) composées du domaine extracellulaire des protéines hCTLA-4, hDR4 et hCD80, h/mCD271 et h/mPD-L1 fusionné avec la protéine IgG1 humaine, ainsi que la protéine humaine IgG1 ont été achetées chez R&D Systems. La protéine recombinante composée du domaine extracellulaire de CD271 humain fusionné avec la protéine IgG2a murine ainsi que la protéine murine IgG2a proviennent de chez AB Bioscience. La TurboFectin 8.0, les plasmides utilisés qui sont des vecteurs d'expression eucaryote pCMV6-XL5 codant pour le CD80, CD86 ou CD271 humain (pCMV6-XL5-hCD80/86/CD271) et pCMV6 codant pour le CD80 ou CD86 murin (pCMV6-mCD80/86) et contenant un gène de résistance à l'ampicilline ont été achetés chez OriGene. Le phorbol myristate acétate (PMA), l'ionomycine, le β -mercaptoethanol (β ME) et le diméthyle sulfoxyde (DMSO) de chez Sigma-Aldrich ont été utilisés. Le kit de marquage intracellulaire a été acheté chez eBioscience. Les kits d'enrichissement de cellules T humaines ou murines proviennent de chez STEMCELL Technologies. Les enzymes de restriction EcoRI,

DpnI et HindIII proviennent de chez New England Biolabs. Les bactéries compétente *E. coli* DH5 α ont été achetées chez Thermo Fisher. Le kit d'extraction d'ADN «midiprep» a été acheté chez Omega Bio-Tek Inc.

2.2 Obtention des lymphocytes T humains

L'utilisation de sang humain a été approuvée par le Comité d'éthique de la recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Du sang périphérique obtenu de donneurs sains, volontaires ayant signé un formulaire de consentement (Annexe 8.1) a été prélevé dans des tubes enduits d'héparine. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées par la méthode de centrifugation en gradients de densités sur du Ficoll-Paque™ PLUS. Les échantillons sanguins ont d'abord été dilués dans du PBS+2%FBS selon un ratio 1:1 et déposés soigneusement sur une couche de Ficoll. Puis, après centrifugation à 450g pendant 30 minutes, sans frein à température ambiante, l'anneau blanchâtre contenant les lymphocytes a été récupéré délicatement avec une pipette et lavé deux fois avec du PBS+2%FBS. Finalement, les PBMC ont été comptés, leur viabilité a été évaluée au bleu de trypan et les cellules ont été congelées dans du FBS+10%DMSO. Les cellules T ont été enrichies par sélection négative avec le kit d'enrichissement de cellules T humaines de STEMCELL Technologies selon le protocole du fabricant. La pureté des cellules a été vérifiée par cytométrie en flux avec les anticorps anti-hCD3, anti-hCD4 et anti-hCD8 α . Avant chaque activation, les PBMC ont été décongelés rapidement au bain marie à 37°C et incubés dans du milieu RPMI complet pendant la nuit à 37°C.

2.3 Modèles murins

L'utilisation de souris a été approuvée par le Comité de protection des animaux du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont en accord avec les principes directeurs formulés par le Conseil canadien de protection des animaux. Les souris de type sauvage C57BL/6 et B6.SJL et des souris déficientes pour CD80 et CD86 provenant de chez Jackson Laboratory ont été utilisées. Les lymphocytes T de souris ont été prélevés au niveau de

la rate et des ganglions qui ont été préalablement broyés et traités avec une solution de lyse d'érythrocytes. Le kit d'enrichissement de lymphocytes T murins de STEMCELL Technologies a été utilisé pour enrichir les cellules T murines par sélection négative selon le protocole du fabricant. La pureté des cellules a été vérifiée par cytométrie en flux avec les anticorps anti-mTCR β , anti-mCD4 et anti-mCD8 α .

2.4 Marquage au carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester (CFSE)

Les cellules T enrichies ont été resuspendues dans une solution de PBS à une concentration de 1×10^7 cell/ml. Une solution de CFSE a été diluée dans du PBS et rajoutée à la suspension cellulaire pour une concentration finale de $1 \mu\text{M}$. La suspension cellulaire a été incubée 10 minutes à 37°C . Après incubation, les cellules ont été lavées avec du milieu RPMI complet (10% de FBS, 4mM L-glutamine, 100 IU pénicilline/100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycine, βME 10^{-5}M) et resuspendues dans du milieu RPMI complet.

2.5 Activation des cellules T humaines et murines

Les anticorps de grade fonctionnel anti-hCD3 ou anti-mCD3 ont été dilués à une concentration de $5 \mu\text{g/ml}$ dans du PBS. Les protéines CD271-Fc, IgG-Fc, PD-L1-Fc, DR4-Fc, CTLA-4-Fc ont été diluées dans la solution d'anticorps anti-CD3 $5 \mu\text{g/ml}$ à une concentration finale de $10 \mu\text{g/ml}$ et immobilisés dans les puits d'une plaque à 96 puits à fond plat pour culture en suspension cellulaire pour 2 à 4 heures à 37°C . Après le lavage des puits, les cellules T marquées ou non au CFSE y ont été mises en culture dans du RPMI complet ($2-3 \times 10^5$ cellules/puits) avec $2 \mu\text{g/ml}$ d'anti-CD28 pour 1, 2, 3 ou 4 jours. Pour chaque condition, des triplicatas expérimentaux ont été faits.

2.6 Marquage extracellulaire et intracellulaire des cellules T

Les cellules T humaines et murines ont été récoltées et marquées premièrement avec le marqueur de viabilité Zombie-Aqua dilué dans du PBS pendant 20 min à température ambiante.

Ensuite, le marquage extracellulaire a été réalisé avec une solution d'anticorps ciblant le CD3, CD4 et CD8 humains ou murins pendant 20 min à 4°C. Pour l'évaluation du niveau d'activation des cellules T humaines à jour 1, l'anticorps anti-hCD69 a été ajouté au mélange d'anticorps.

Pour l'évaluation de la production de cytokines par les cellules T humaines, deux jours après la stimulation, une solution composée de PMA, d'ionomycine et de BD GolgiPlugTM a été diluée dans du milieu RPMI complet et rajoutée au milieu de culture pour une concentration finale de 1ng/ml pour la PMA, 0,01µ/ml pour l'ionomycine et 0,002µg/ml pour le BD GolgiPlugTM. Après l'ajout de la solution de PMA/ionomycine et de BD GolgiPlugTM, les cellules ont été incubées pour 4 heures à 37°C suivi d'un marquage extracellulaire effectué selon la procédure précédemment décrite. Suite au marquage extracellulaire, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec la solution de cytofix/cytoperm du kit de marquage intracellulaire de chez eBioscience. Après la fixation et la perméabilisation, les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-hIFN γ , anti-hTNF- α et anti-hIL-2 préalablement dilués dans une solution perm/wash du kit de marquage extracellulaire. Puis, une analyse à la cytométrie de flux a été effectuée.

Les appareils BD LSRFortessa X20 et BD LSRII ont permis d'obtenir les données de cytométrie en flux. Le logiciel Flowjo version 10 a été utilisé pour l'analyse des données obtenues.

2.7 Mutagenèse dirigée

L'application «Quik Change Primer Design» a permis de déterminer la séquence des amorces sens et anti-sens nécessaire pour introduire des mutations au niveau de sites correspondant aux régions riches en cystéine de la séquence du gène codant pour CD271 (Figure 4). Les amorces ont été commandées chez Invitrogen grâce aux séquences que nous avons déterminées (Annexe 8.2). Les mutations ont été introduites au niveau de la séquence de CD271 par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Premièrement, un mix composé de tampon de réaction PCR, de plasmides codants pour le CD271, d'amorce sens (0,4µM) et d'amorce anti-sens (0,4µM) spécifiques pour la mutation de cystéines données, de dNTP (0,2mM), de DMSO (3%), d'ADN polymérase PfuUltra HF (2,5U) et d'eau exempt de nucléase a été préparé. Puis,

la réaction PCR a été effectuée dans les conditions suivantes : 30 sec de réchauffement du bloc PCR à 95°C, suivi de 19 cycles de dénaturation/hybridation/élongation à 95°C (30 sec), 55°C (1 min), 68°C (12 min), 68°C (5 min). Finalement, le produit PCR obtenu a été digéré avec l'enzyme DpnI qui digère spécifiquement les brins d'ADN parentaux puis une transformation bactérienne a été effectuée. Suite à la transformation bactérienne, l'ADN a été extrait par «midiprep» selon le protocole du fabricant du kit d'extraction et sa séquence a été validée par un séquençage effectué par le service de séquençage de l'Institut de recherche en immunologie et en cancérologie de l'Université de Montréal.

À partir de la séquence d'ADN codant pour le CD80 humain de type sauvage, les résidus tryptophane 84 (W84) et tyrosine 87 (Y87) ont été identifiés. Puis les brins d'ADN de CD80 de type sauvage ou au niveau desquels le résidu W84 ou le Y87 a été muté en alanine ont été commandés chez Invitrogen et clonés dans le vecteur d'expression eucaryote pICherryNeo.

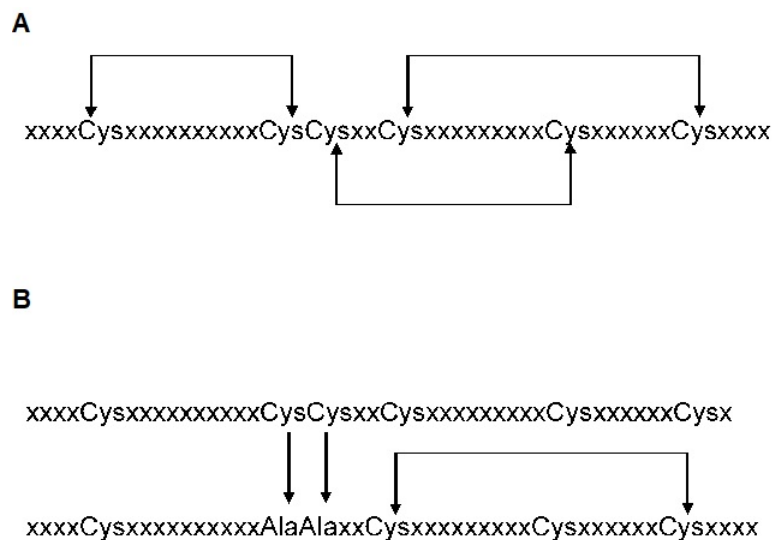


Figure 3. Schéma d'un domaine riche en cystéine de CD271. (A) Schéma représentant la séquence d'acides aminés du domaine riche en cystéine 1 (C1) de CD271 ainsi que les interactions entre ses différentes cystéines (Cys). (B) Une paire de cystéines adjacentes a été substituée par des alanines (Ala) avec la technique de mutagenèse dirigée afin d'interrompre deux des trois interactions cystéine-cystéine. La même technique a été utilisée pour introduire les mutations au niveau de chaque région riche en cystéine de la portion extracellulaire de CD271. "x" représente un acide aminé.

2.8 Test de liaison

Les cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides pCherryNeo-hCD80 ou pCMV6-XL5-hCD271 WT ou mutant; ou avec les plasmides pCMV6-XL5-hCD80/86 ou pCMV6-mCD80/86. La veille de chaque transfection, les cellules 293T ont été mises en culture dans du milieu DMEM complet (10%FBS, 100IU P/100µg/ml S) dans les puits d'une plaque pour culture adhérente puis transfectées le jour suivant avec 2,5 µg de plasmide. 48 heures après la transfection, les cellules 293T ont été distribuées à une densité de 2×10^5 cellules/puits dans une plaque à 96 puits à fond en V et resuspendues dans 25µl de protéines recombinantes humaines CTLA-4 (contrôle positif), IgG1 (contrôle négatif) ou CD271 (protéines d'intérêt) (10µg/ml) dilué dans du PBS. Puis, les cellules transfectées ont été incubées 30 min à température ambiante. Après l'incubation avec les protéines Fc, les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-hIgG capable de reconnaître la portion Fc des protéines recombinantes. Une analyse de cytométrie en flux a ensuite été faite pour détecter les liaisons entre les protéines recombinantes et les cellules transfectées ou non. Certaines cellules ont été incubées avec les anticorps ciblant le CD80 ou CD86 humain ou murin ou avec l'anticorps anti-hCD271 pour déterminer l'expression de surface par cytométrie en flux.

2.9 Technique de résonance plasmonique de surface (SPR)

La détermination de l'affinité de différentes interactions par SPR a été réalisée à la plateforme de l'Université McGill avec l'appareil BIAcore 3000. Brièvement, les protéines recombinantes CTLA-4, CD28 et CD271 ont été couplées à la surface d'un capteur. Le couplage s'est fait via des liaisons covalentes entre les protéines et des amines se trouvant à la surface du capteur. La protéine recombinante CD80 a été diluée à des concentrations croissantes allant de 0 à 100nM et injectée à un débit de 25µl/min pour 5 min. Une solution de BSA ou de protéine IgG a été utilisée comme contrôle négatif. La période d'association correspondant aux 5 min d'injection de CD80 soluble a été suivie d'un temps de dissociation allant de 60 à 600 sec.

2.10 Statistiques

Le logiciel GraphPad prism version 7 a permis de générer les graphiques et de faire les différents tests statistiques relatifs à l'activation, à la production de cytokines des cellules T et à l'intensité moyenne de fluorescence des tests de liaison. La signification statistique de la différence de moyenne observée entre deux conditions a été calculé selon un test de Student non-apparié avec un intervalle de confiance de 95%. "n" représente le nombre d'expériences effectuées avec différents donneurs. Dans chaque expérience, des triplicatas expérimentaux ont été faits pour chaque condition. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$.

3 RÉSULTATS

3.1 CD271 interagit spécifiquement avec le CD80 humain

CD80, un membre de la famille B7, est reconnu pour interagir avec les molécules CD28, CTLA-4 et PD-L1 (172). Via une technique de micropuce à protéine, une étude a identifié une interaction potentielle entre CD271 et le CD80 humain (171). Cependant, aucune étude subséquente n'a été faite pour déterminer la spécificité, ni la fonction de celle-ci. Comme CD80 est une molécule clé dans le système immunitaire, notamment de par son implication dans l'activation des cellules T (84), nous avons voulu caractériser l'interaction CD271-CD80. Étant donné que CTLA-4 et CD28 interagissent également avec CD86 un autre membre de la famille B7, nous avons voulu déterminer si en plus de CD80, CD271 pourrait interagir avec CD86. Dans un premier temps, nous avons cherché à confirmer que CD271 et CD80 interagissent ensemble et spécifier cette interaction en utilisant un système de test de liaison *in vitro*. Pour cela, nous avons transfecté des cellules 293T qui n'expriment pas normalement les protéines CD80 et CD86 avec des plasmides codant pour le CD80 ou le CD86 humain ou murin. Ces cellules ont ensuite été incubées avec des protéines recombinantes. L'huIgG a été utilisé comme contrôle négatif et le CTLA-4-huIgG comme contrôle positif. Tel qu'attendu, nos résultats montrent que l'IgG ne se lie à aucune des cellules exprimant le CD80 ou CD86, tandis que le CTLA-4 humain ou murin interagit avec toutes les cellules exprimant le CD80 et le CD86 humain ou murin (Figure 4A). Quant au CD271 humain ou murin, il se lie uniquement au CD80 humain, mais pas au CD80 murin, ni au CD86 humain ou murin, ce qui implique qu'il existe une spécificité au niveau de la structure du CD80 humain qui permet la liaison du CD271 humain et murin (Figure 4A). Pour confirmer l'interaction CD80-CD271, nous avons procédé à un test de liaison inverse entre CD80 humain et CD271 humain, en utilisant des cellules 293T que nous avons transfectées avec le plasmide pCMV6-XL5-CD271 codant pour le CD271 humain et en utilisant la protéine recombinante CD80-huIgG pour les essais de liaison. Les résultats montrent également une interaction entre le CD271 et le CD80 humain (Figure 4B). Ainsi, nos données confirment que CD271 interagit avec le CD80 humain et montrent que cette interaction est spécifique à l'humain. Par ailleurs, nos résultats montrent que le CTLA-4 se lie

à toutes les cellules exprimant le CD80 humain tandis que le CD271 ne se lie qu'à une faible proportion de ces cellules.

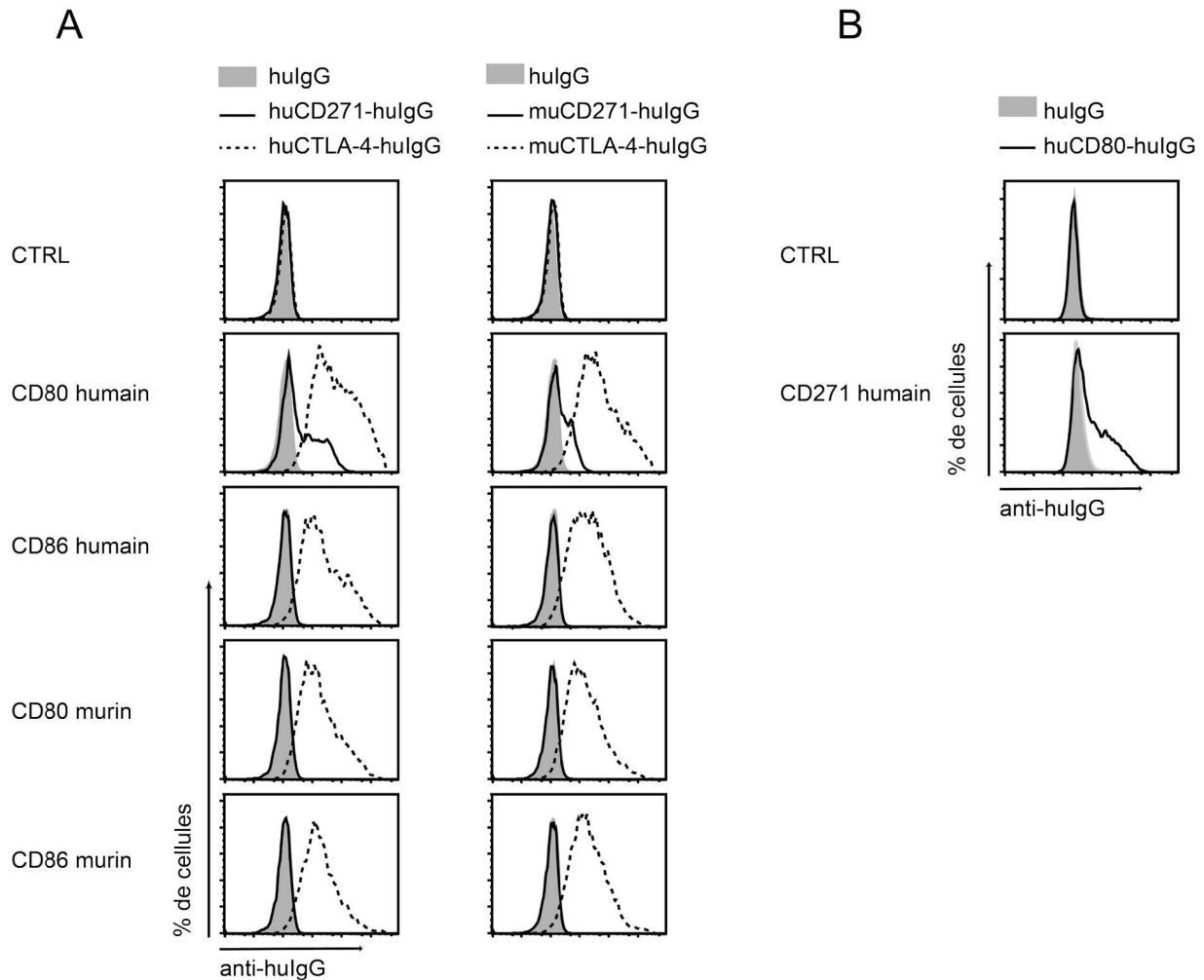


Figure 4. CD271 se lie spécifiquement au CD80 humain. (A) Test de liaison avec les cellules transfectées avec un plasmide pCMV6-XL5-hCD80/86 ou pMV6-mCD80/86 réalisé en incubant les cellules transfectées et non transfectées (CTRL) avec les protéines recombinantes (Fc) humaines huIgG, CTLA-4-huIgG, CD271-huIgG suivi d'un marquage avec l'anticorps anti-IgG humain et d'une analyse à la cytométrie en flux. (B) Évaluation de la liaison de CD80-huIgG humain avec le CD271 en incubant les cellules transfectées avec un plasmide pCMV6-XL5-hCD271 avec les protéines Fc humaines huIgG ou CD80-huIgG. $n \geq 3$. Les résultats montrés proviennent d'une expérience représentative.

3.2 CD271 se lie uniquement aux cellules exprimant de hauts niveaux de CD80

Comme notre test de liaison montre que CD271 se lie seulement à une proportion des cellules exprimant CD80 (Figure 4), nous avons posé l'hypothèse que CD271 se lie à la proportion de cellules exprimant de hauts niveaux de CD80 (CD80hi). Nous avons évalué le niveau d'expression extracellulaire des protéines CD80 humain et confirmé l'existence de deux populations, la population CD80hi exprimant de haut niveau de protéine et la population CD80lo exprimant de faible niveau de protéine (Figure 5A). Pour tester notre hypothèse, nous avons incubé les cellules ayant été transfectées avec CD80 simultanément avec la protéine CD271-huIgG et l'anticorps anti-huCD80. Ceci a permis de distinguer les populations de cellule CD80hi et CD80lo. En sélectionnant chacune des deux populations, on peut voir qu'en effet seules les cellules CD80hi interagissent avec le CD271 (Figure 5B). Des résultats similaires ont été obtenus avec le marquage de cellules transfectées avec CD271 (Figure 5C) et le test de liaison inverse utilisant l'anti-CD271 et le CD80-huIG, montrant également que le CD80 se lie seulement aux cellules CD271hi (Figure 5D).

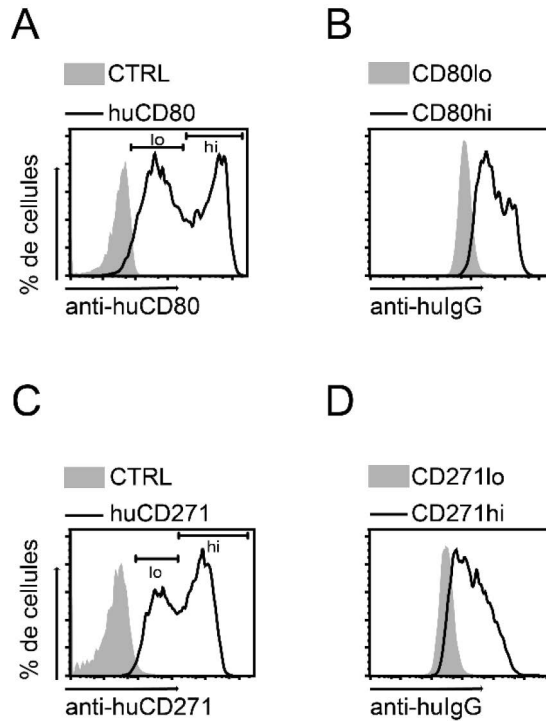


Figure 5. CD271 se lie uniquement aux cellules exprimant de haut niveau de CD80. La méthode de cytométrie en flux a été utilisée pour évaluer l'expression des protéines CD80 (A) et CD271 (C) à la surface des cellules surexprimant le CD80 ou CD271. La liaison de CD271-huIgG humain avec les cellules CD80hi versus CD80lo (B) et celle de CD80-huIgG humain avec les cellules CD271hi versus CD271lo (D) a également été évaluée. $n \geq 3$. Les résultats montrés proviennent d'une expérience représentative.

3.3 L'affinité de l'interaction CD271-CD80 est intermédiaire à celle de CTLA-4-CD80 et CD28-CD80

Étant donné que CD271-huIgG se lie uniquement aux cellules CD80hi et CD80-huIgG uniquement aux cellules CD271hi, nous avons voulu déterminer l'affinité relative de l'interaction CD271-CD80 avec la technique de SPR. Les protéines recombinantes CD28, CD271 et CTLA-4 sous forme dimérique ont été immobilisées sur la surface couplée d'un capteur tandis qu'un flux de CD80 soluble a été injecté dans la cellule microfluidique de l'appareil, à des concentrations croissantes pendant une période de temps donnée. Cette période correspondait au temps d'association entre le CD80 et chaque protéine recombinante et était suivie d'un temps de dissociation. Ceci a permis de d'estimer l'affinité relative de la liaison du CD80 avec les différentes protéines recombinantes en fonction des concentrations croissantes du CD80 et du temps. Les résultats suggèrent que l'affinité de CD271 pour CD80 est intermédiaire à celles de CTLA-4 et CD28 (Figure 6).

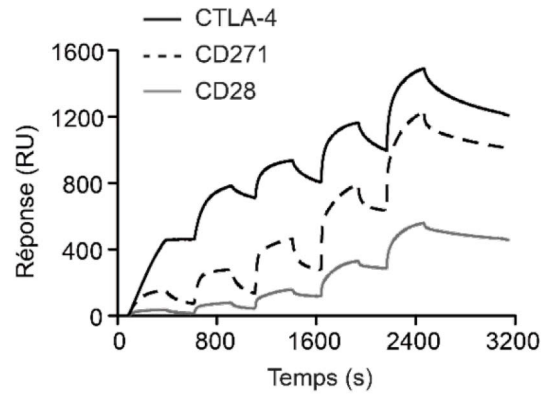


Figure 6. L'affinité de l'interaction CD271-CD80 est intermédiaire à celle de CTLA-4-CD80 et CD28-CD80. La liaison spécifique dose dépendante de la protéine recombinante dimérique CD80 humain avec des protéines recombinantes dimériques immobilisées CTLA-4 (noir), CD28 (gris) et CD271 (tiret) été évaluée par la méthode SPR. Chaque variation croissante de la courbe correspond à la mesure de l'affinité de la courbe en fonction de la concentration croissante de la protéine dimérique CD80 humain. n=2.

Les résultats montrés proviennent d'une expérience représentative.

3.4 Les régions riches en cystéines C1 et C2 de CD271 ne sont pas nécessaires pour l'interaction de CD271 avec CD80

Nos résultats précédents montrent que CD271 interagit spécifiquement avec le CD80 humain. Nous avons donc voulu caractériser davantage cette interaction en déterminant quelles régions de CD271 sont importantes pour sa liaison avec le CD80 humain. Le domaine extracellulaire de CD271 est composé de quatre régions riches en cystéines qui sont importantes pour son interaction avec les différentes neurotrophines (150, 173). Des études ont effectivement montré que la délétion de la portion extracellulaire de CD271, mais pas celle de sa portion intracellulaire, abrogeait sa liaison avec NGF (150, 173). Il a également été montré que la mutation de deux cystéines adjacentes dans une des régions riches en cystéine de CD271 provoquait la rupture de sa liaison avec NGF (150). Pour caractériser l'interaction entre CD271 et CD80, nous avons donc choisi de déterminer quelles régions riches en cystéine de CD271 sont importantes pour cette interaction en induisant la mutation de cystéines adjacentes en alanine dans chacune des quatre régions riches en cystéines (Figure 3). Pour cela, nous avons utilisé le gène CD271 WT ainsi que C1, C2, C3 et C4 qui sont quatre mutants de CD271 contenant des mutations dans les domaines riches en cystéine 1, 2, 3 et 4 respectivement. Ces constructions ont été transfectées dans des cellules 293T. Après la transfection, les cellules ont été utilisées pour faire des essais de liaison avec la protéine recombinante CD80-huIgG. Les résultats montrent que les mutants C1 et C2 se lient au CD80-huIgG (Figure 7A). Ces régions ne semblent donc pas importantes pour l'interaction de CD271 avec CD80. Par contre, les mutants C3 et C4 ne se lient pas au CD80-huIgG. Cependant, après avoir effectué un marquage extracellulaire pour vérifier l'expression des différentes protéines mutantes, l'expression des mutants C3 et C4 n'est pas détectable à la surface des cellules transfectées (Figure 7B, à gauche). Dans la littérature, des données montrent que la présence de mutation dans certains domaines protéiques peut empêcher l'expression de protéines à la surface cellulaire et plutôt induire leur localisation au niveau intracellulaire (174, 175). C'est peut-être le cas pour les mutants C3 et C4. Aussi, lorsque des protéines sont mal repliées, elles sont dégradées (176). Il existe ainsi la probabilité que les mutants C3 et C4 ne soient pas exprimés au niveau extracellulaire car ils ont été dégradés à cause d'un mauvais repliement.

Par ailleurs, il est possible que la substitution d'acide aminé ait provoqué une modification de la conformation de la protéine, conduisant ainsi à un changement de la structure du site reconnu par le clone de l'anticorps utilisé pour le marquage (anticorps anti-huCD271 clone ME20.4). Nous avons alors décidé de tester un autre clone de cet anticorps; le clone MLR2, pour voir si celui-ci permettrait de détecter l'expression de surface de C3 et C4. Cependant, comme avec le clone ME20.4, les résultats montrent que le clone MLR2 ne permet pas non plus de détecter l'expression de surface des mutants C3 et C4 (Figure 7B, à droite). Étant donné que les deux clones d'anticorps utilisés ne permettent pas de détecter l'expression de surface de ces deux mutants, il est alors impossible de confirmer l'importance des régions C3 et C4 pour l'interaction CD271-CD80.

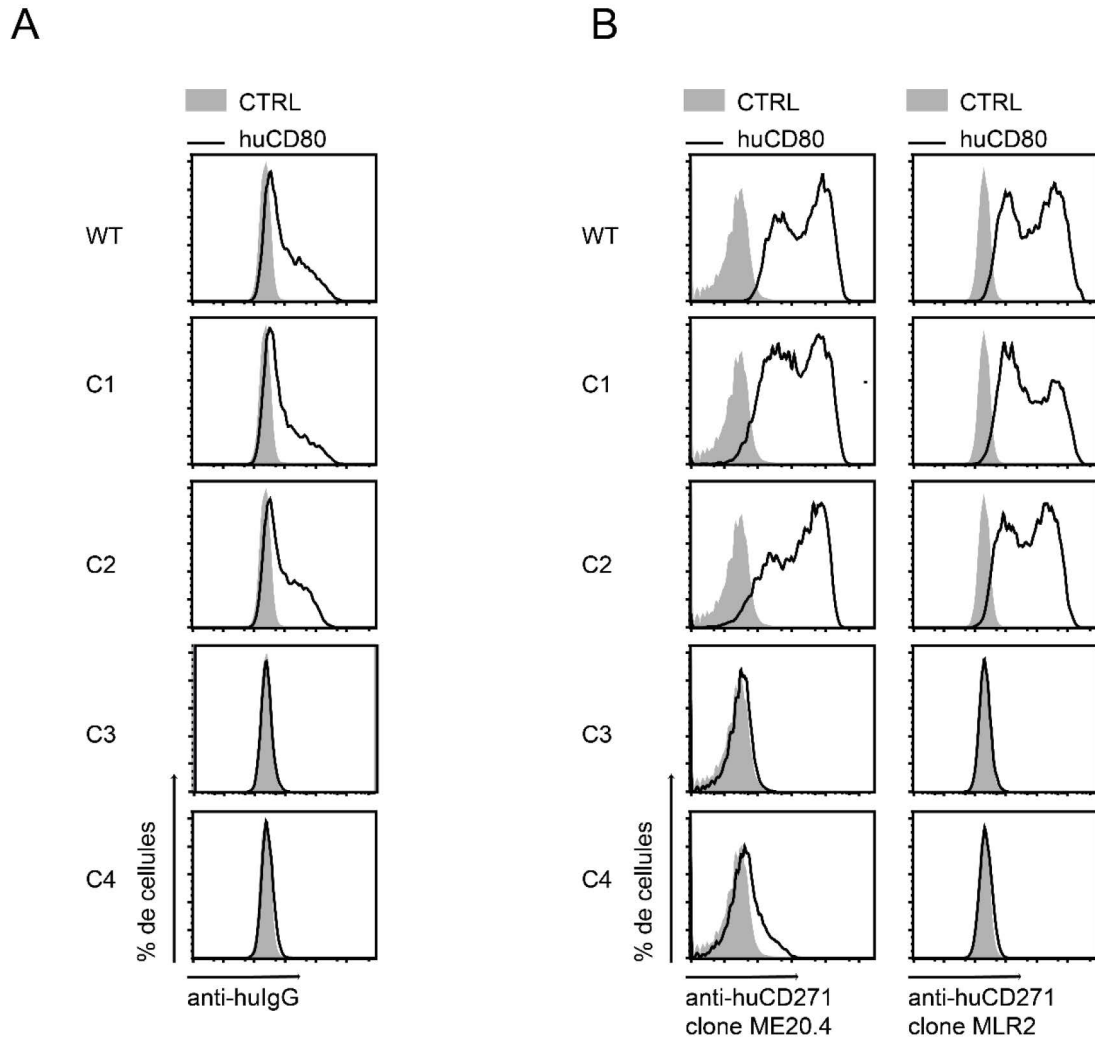


Figure 7. Les régions riches en cystéine 1 et 2 du CD271 humain ne sont pas nécessaires pour son interaction avec le CD80. Des cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide contenant l'ADN codant pour le CD271 WT ou le CD271 muté au niveau de la région riche en cystéine 1, 2, 3 ou 4 (C1, C2, C3 ou C4). (A) Un test de liaison a été réalisé en incubant les cellules transfectées ou non transfectées (CTRL) avec la protéine recombinante humaine CD80-huIgG, suivit d'un marquage avec l'anticorps anti-IgG humain et la liaison de CD80-hIgG avec les cellules a été évaluée par cytométrie en flux. (B) L'expression des protéines à la surface des cellules a été évaluée par cytométrie en flux après avoir marqué les cellules avec le clone ME20.4 (gauche) et MLR2 (droite) de l'anticorps anti-CD271 humain.

3.5 Deux acides aminés dans le domaine V du CD80 humain sont importants pour la liaison de CD271

Une étude visant à caractériser les bases moléculaires de l'interaction de CD80 avec CD28 et CTLA-4 a montré que la substitution du tryptophane 84 (W84) ou de la tyrosine 87 (Y84) du domaine IgV du CD80 humain en alanine (A) abroge la liaison de CD28 avec CD80 et réduit celle de CTLA-4 avec CD80 (177). Nous avons ainsi voulu déterminer si ces deux acides aminés pourraient également être importants pour la liaison de CD271. Après avoir généré les mutants W84A et Y84A de CD80, nous les avons transfectés dans des cellules 293T. Par la suite, nous avons fait un marquage extracellulaire afin de confirmer que les mutants étaient exprimés à la surface des cellules (Figure 8A). Finalement, un essai de liaison avec les protéines recombinantes IgG, CTLA-4, CD28 et CD271 a montré que l'interaction de CTLA-4 avec les mutants de CD80 a tendance à être réduite comparativement à son interaction avec le CD80 natif tandis que celle de CD28 est quasiment abolie comme il avait été précédemment démontré (Figure 8B) (177). Aucune liaison de CD271 n'a été détectée suggérant que les résidus W84 et Y84 jouent un rôle important dans l'interaction CD80-CD271 humain (Figure 8B)

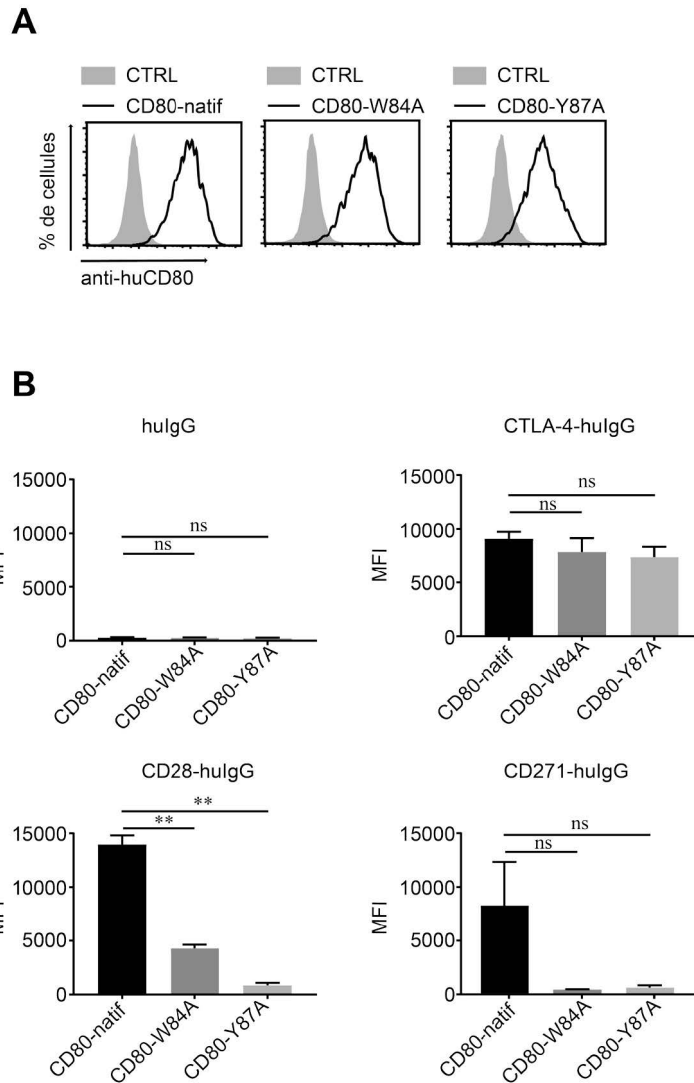


Figure 8. Deux acides aminés dans le domaine V du CD80 humain sont importants pour la liaison de CD271. Des cellules 293T ont été transfectées avec le CD80 humain natif (CD80-natif), le CD80-W84A ou le CD80-Y87A. 48 heures après la transfection, l'expression extracellulaire de CD80 a été déterminée par cytométrie en flux suite à un marquage avec l'anticorps anti-huCD80 (A) et un test de liaison a été fait avec les protéines recombinantes IgG, CTLA-4, CD28 et CD271 (B). Une analyse de cytométrie en flux a été effectuée et l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) a été utilisée pour quantifier les interactions entre protéines. ns : statistiquement non significatif, ** $p < 0.01$ $n \geq 2$.

3.6 CD271 inhibe l'activation, la prolifération et la production de cytokines des cellules T humaines

Nos résultats de tests de liaison et de SPR montrent que CD271 se lie au CD80 humain. Étant donné le rôle important de CD80 dans la fonction des cellules T et que l'expression de CD271 par certaines cellules cancéreuses est associée à de l'immunosuppression, nous avons voulu déterminer l'effet de CD271 sur la fonction des cellules T (166). Dans un système *in vitro*, nous avons évalué l'effet de CD271 sur l'activation, la prolifération et la production de cytokines des cellules T humaines. Le pourcentage de cellules exprimant CD69, un marqueur de l'activation précoce des cellules T, a été utilisé comme référence pour évaluer le niveau d'activation des cellules T et la dilution du CFSE a été utilisée pour évaluer leur prolifération en présence ou en absence des protéines immobilisées, huIgG contrôle, CD271-huIgG, PD-L1-huIgG, DR-4-huIgG et CTLA-4-huIgG (Figure 9 et 10). Tel qu'attendu, nos résultats montrent que lorsque les cellules T sont stimulées avec les anticorps anti-CD3/28, seuls ou en présence de l'IgG, le pourcentage de cellules exprimant le marqueur d'activation CD69 est augmenté (Figure 9). Pareillement, lors de la stimulation des cellules T avec les anticorps anti-CD3/28 seuls ou en présence de l'IgG, le CFSE est dilué et on obtient plusieurs pics qui correspondent chacun à une nouvelle génération de cellules (Figure 10). Les protéines DR4 et CTLA-4 ont été utilisées comme des protéines contrôles qui ne devraient pas voir d'impact sur l'activation des cellules T (178, 179). Les résultats obtenus montrent que comparativement à CD271, la présence des protéines DR4 et CTLA-4 n'inhibe pas l'activation des cellules T ni leur prolifération (Figure 9 et 10). Nous avons également utilisé le PD-L1-huIgG comme contrôle positif car PD-L1 est une molécule de cosignalisation reconnue pour inhiber la fonction des cellules T via sa liaison à PD-1 ou CD80 exprimés sur les cellules T. Nos résultats montrent que lorsque les cellules T sont activées en présence de PD-L1-huIgG, leur l'activation et leur prolifération sont effectivement inhibées (Figure 9 et 10). Ces résultats concordent avec des données de la littérature, qui montrent que la présence d'une protéine recombinante PD-L1-Ig dans le milieu d'activation *in vitro* inhibe la prolifération des cellules T (118).

Nous avons aussi évalué si la présence de CD271 dans le milieu d'activation avait un effet sur la fonction des cellules T en estimant la production d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF- α , qui sont des cytokines importantes pour la lutte anti tumorale (180-182). Le pourcentage de cellules

T humaines produisant ces différentes cytokines en présence de CD271-huIgG a été évalué et nos résultats montrent que CD271 inhibe également la production de cytokines par les cellules T humaines, et notre contrôle positif, PD-L1 inhibe aussi comme attendu la production de cytokines (Figure 11).

Par ailleurs, des études indiquent que le type de cellules dans lequel les protéines recombinantes sont produites influence leurs modifications post transcriptionnelles, ce qui affecte leur conformation et leur fonction (183). Nous avons donc voulu faire une expérience complémentaire afin de tester l'effet d'une deuxième protéine CD271 provenant d'une autre source et fusionnée avec un IgG2a murin. Nos résultats ont montré que cette protéine inhibe également la prolifération des cellules T (Figure 12). Nous pouvons ainsi conclure que CD271 inhibe l'activation et la prolifération des cellules T.

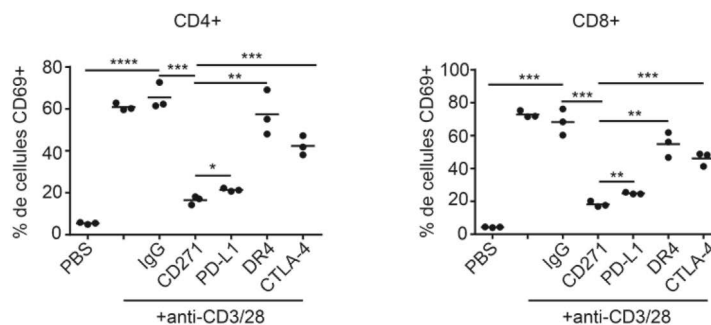


Figure 9. CD271 inhibe l'activation des cellules T humaines. Les cellules T humaines ont été stimulées avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (α CD3/28) en présence ou en absence de la protéine recombinante CD271-huIgG humaine ou des protéines recombinantes contrôles IgG, PD-L1, DR4, CTLA-4-huIgG humaines. 24 heures après la stimulation, les cellules T ont été récoltées, marquées avec les anticorps fluorescents anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD69 humains et une analyse par cytométrie en flux a été réalisée pour mesurer le niveau d'activation. $n \geq 3$ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$.

Les résultats montrés sont des triplicatas obtenus pour un même donneur et proviennent d'une expérience représentative.

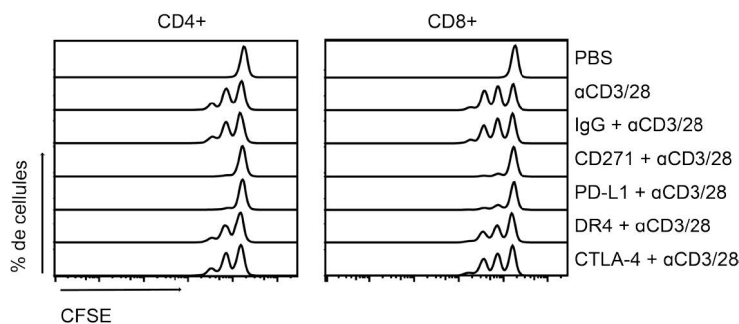


Figure 10. CD271 inhibe la prolifération des cellules T humaines. Les cellules T humaines ont été marquées avec du carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester (CFSE) avant d'être activées avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (α CD3/28). L'activation a été faite en présence ou en absence de la protéine humaine CD271-huIgG et d'autres protéines de la compagnie R&D. 72 à 96 heures après la stimulation, la prolifération des cellules T a été évaluée par cytométrie en flux. $n \geq 3$.

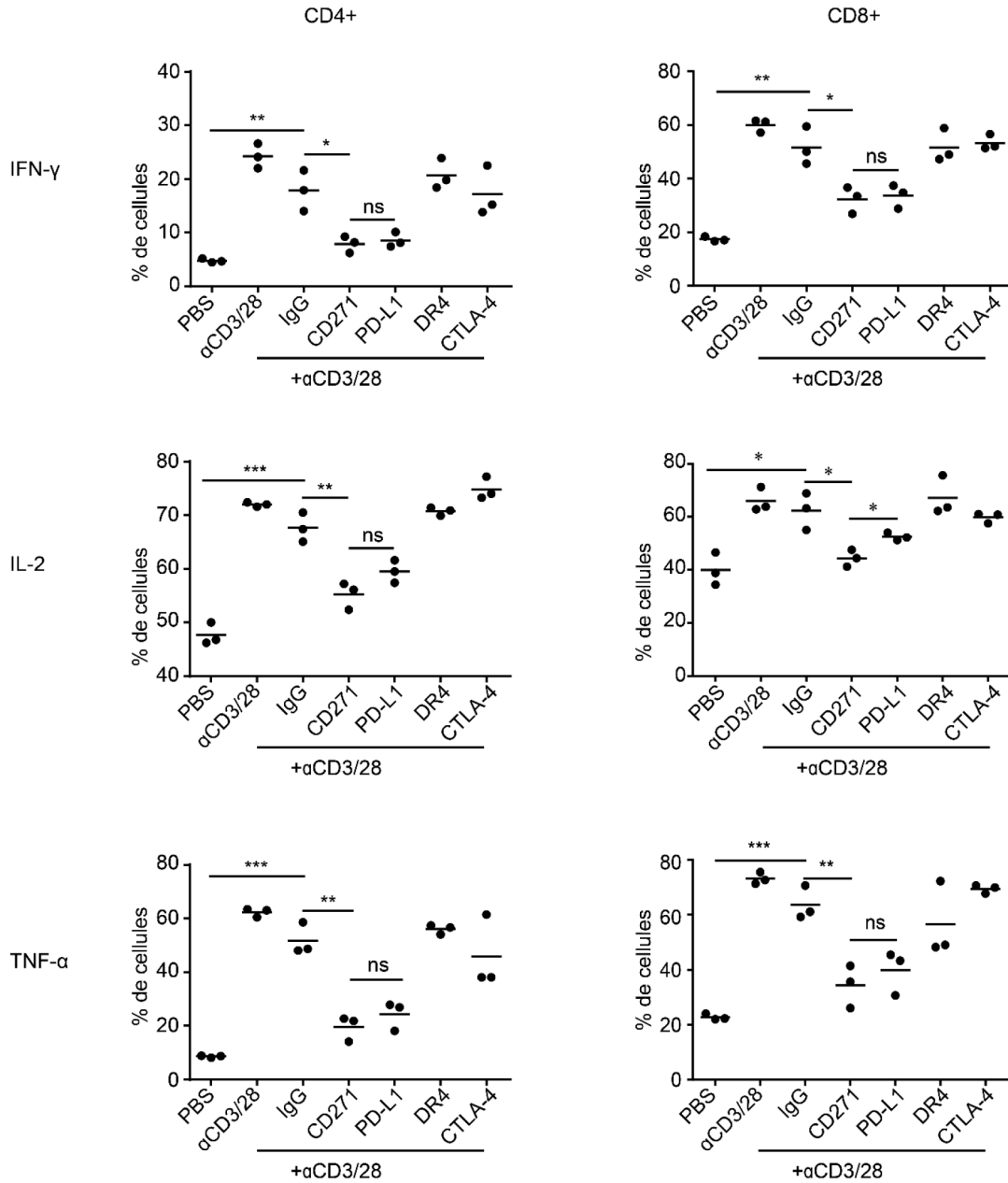


Figure 11. CD271 inhibe la production de cytokine des cellules T humaines. La production de cytokines par les cellules T humaines activées en présence ou en l'absence de CD271-huIgG a été évaluée 48 heures après la stimulation. ns : statistiquement non significatif, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$. $n \geq 3$.

Les résultats montrés sont des triplicatas obtenus pour un même donneur et proviennent d'une expérience représentative.

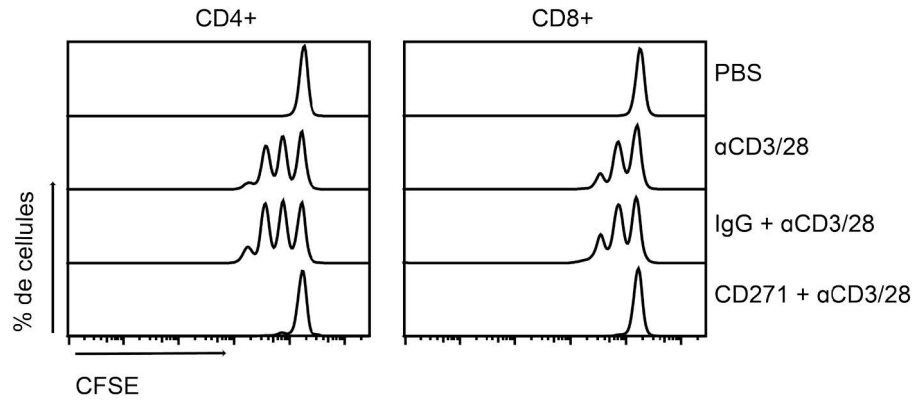


Figure 12. CD271 inhibe la prolifération des cellules T humaines. L'activation des cellules T a été faite en présence ou en absence de la protéine recombinante humaine CD271-muIgG ou du contrôle muIgG de la compagnie AB. 72 à 96 heures après la stimulation, la prolifération des cellules T a été évaluée par cytométrie en flux. $n \geq 3$.

Les résultats montrés proviennent d'une expérience représentative.

3.7 CD271 inhibe également la prolifération des cellules murines *in vitro*

Comme CD271 se lie spécifiquement au CD80 humain, nous avons cherché à déterminer son effet sur la prolifération des cellules T murines. Si la molécule CD271 inhibe l'activation des cellules T via CD80, nous nous attendrions à ce qu'elle n'affecte pas l'activation des cellules T murines puisque CD271 interagit spécifiquement avec le CD80 humain. En activant les cellules T de souris WT en présence de la protéine recombinante murine CD271-Fc, nous avons montré que leur prolifération est inhibée (Figure 13). Pour confirmer cette observation, nous avons utilisé des cellules T de souris déficientes pour CD80 et CD86 (CD80/CD86^{-/-}) que nous avons activées également en présence de CD271-Fc et nos données montrent que la présence de CD271-Fc inhibe la prolifération des cellules T murines CD80/CD86^{-/-}. Donc CD80 n'est pas la molécule via laquelle CD271 induit ses effets inhibiteurs ou du moins n'est pas la seule molécule médiatrice des effets de CD271 au niveau des cellules T.

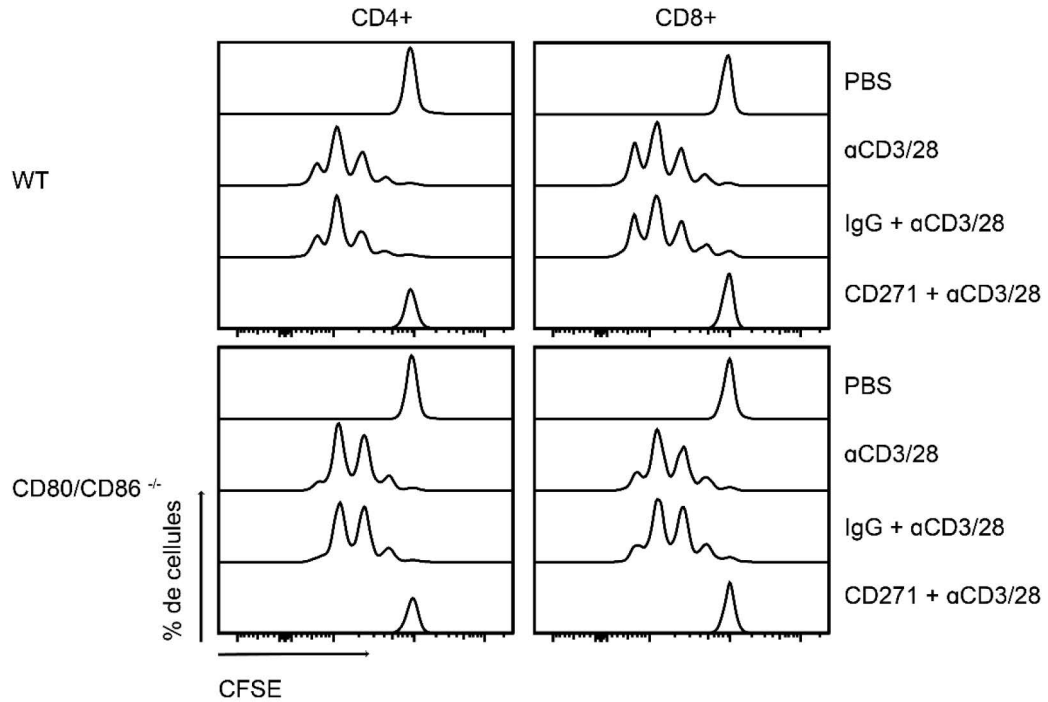


Figure 13. L'inhibition de la prolifération des cellules T murines par CD271 est indépendante de CD80. Les cellules T murines de souris de type sauvages (WT) ou déficientes pour CD80 et CD86 (CD80/CD86^{-/-}) ont été préalablement marquées avec du CFSE puis activées avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (αCD3/28) en présence ou en absence de la protéine recombinante murine CD271-huIgG ou de la protéine contrôle IgG. 72 à 96 heures après la stimulation, une analyse de cytométrie en flux a été réalisée pour mesurer le niveau de prolifération. n≥3.

Les résultats montrés proviennent d'une expérience représentative.

4 DISCUSSION

Les molécules de cosignalisation appartiennent à la famille des IgSF et des TNFRSF et jouent un rôle clé dans la régulation de la fonction des cellules T. Certaines d'entre elles ont été bien caractérisées et représentent des cibles thérapeutiques dans le traitement de certains cancers. Cependant, la fonction de plusieurs de ces molécules reste encore inconnue. Nous avons choisi de caractériser CD271, un membre de la TNFRSF dont l'expression semble corrélérer avec l'immunosuppression et l'évasion tumorale. Notre étude consistait dans un premier temps à confirmer et à caractériser son interaction avec certains membres de la famille B7, puis à déterminer son impact sur la fonction des cellules T. Nos résultats ont montré que le CD271 interagit spécifiquement avec le CD80 humain, un membre de la IgSF, et suggèrent que des résidus conservés dans les CD80/86 humains ou murins sont importants pour l'interaction du CD80 humain avec le CD271. De plus, nous avons identifié CD271 comme une molécule ayant potentiellement un rôle immunorégulateur sur la fonction des cellules T. En effet, l'activation des cellules T en présence de la protéine recombinante CD271-Fc est inhibée, indiquant ainsi que CD271 pourrait jouer un rôle de coinhibition.

4.1 L'interaction interfamille IgSF-TNFRSF

D'une manière générale, les membres de la IgSF interagissent avec d'autres membres de la IgSF et, de même, les membres de la TNFRSF interagissent entre eux. L'interaction de HVEM une molécule membre de la TNFRSF, avec deux membres de la IgSF, BTLA et CD160, constitue une exception à cette règle. Ces interactions entre des membres de différentes superfamilles sont jusque-là les seules à avoir été reportées dans la littérature (184). Il est à noter que HVEM interagit également avec un autre membre de la TNFRSF appelé LIGHT, et que cette interaction stimule l'activation des cellules T, alors que lorsque HVEM interagit avec les membres de la IgSF, cette activation est inhibée (184). Notre étude confirme l'existence d'une autre interaction entre le CD271, un membre de la TNFRSF, et le CD80, un membre de la IgSF, et elle suggère que cette interaction pourrait participer à l'inhibition de l'activation des

cellules T, ce qui amène à se poser la question à savoir si les interactions IgSF-TNFRSF sont généralement impliquées dans l'inhibition de la fonction des cellules T.

4.2 La spécificité et les sites de l'interaction entre CD80 et CD271

Le fait que CD271 interagisse spécifiquement avec le CD80 humain, mais pas avec le CD80 murin ni avec le CD86 humain ou murin peut être expliqué par les différences dans la séquence d'acides aminés qui existent entre ces différentes molécules. Avec seulement 20% d'homologie au niveau de la séquence d'acides aminés, le CD80 et CD86 ont la même structure globale et partagent les mêmes récepteurs CD28 et CTLA-4 (185-187). Malgré cette similitude structurale, CD271 interagit avec le CD80 humain mais pas avec le CD86 ce qui semble indiquer que c'est la grande différence dans la séquence d'acides aminés qui semble avoir un impact sur la liaison de CD271. Aussi, la surface d'interaction du CD80 humain avec CD271 pourrait être formée au niveau des résidus d'acides aminés présent uniquement dans le CD80 humain. Il en serait de même pour le CD80 humain et le CD80 murin, qui partagent seulement 40% d'homologie (186).

Cependant, bien que les résultats suggèrent que des acides aminés spécifiques au CD80 humain sont responsables de son interaction avec le CD271, la mutation du résidu W84 conservé au niveau du CD80 humain et murin et celle du Y87 conservé au niveau des CD80 et CD86 humains et murins semble abroger complètement l'interaction entre le CD271 et CD80 humain. Ces résidus d'acide aminés importants pour l'interaction de CD80 avec CD28 et CTLA-4 apparaissent également importants pour la liaison de CD271 au CD80 humain. En fonction de la molécule et de l'espèce, ces résidus pourraient donc être impliqués dans diverses interactions avec d'autres acides aminés qui conduisent à des différences importantes dans l'arrangement structural des molécules, créant ainsi une région de liaison de CD271 au niveau du CD80 humain mais pas au niveau des autres molécules. Le CD80 est composé de deux domaines extracellulaires IgV et d'un IgC, qui sont tous les deux importants pour la liaison de CD28 et CTLA-4 (188). Il serait donc intéressant de faire des tronctions ou des substitutions de ces domaines afin de déterminer lequel joue un rôle primordial dans la liaison de CD271.

4.3 Mutation des résidus riches en cystéine de CD271

Les mutations ponctuelles que nous avons introduites dans le domaine riche en cystéine du CD271 humain ne nous ont pas permis de faire une conclusion sur le rôle de ces domaines dans l'interaction de CD271 avec le CD80 humain. Néanmoins, étant donné le rôle important de ces domaines dans l'interaction du CD271 avec le NGF et dans la liaison de plusieurs autres membres de la TNFRSF avec leur ligand ou récepteur, il serait intéressant de faire des ablations complètes ou partielles de ces différents domaines dans le CD271 au lieu de mutations ponctuelles (189, 190). On pourrait également réaliser des compétitions de liaison au CD271 entre le CD80 humain et les différentes neurotrophines afin de déterminer respectivement quel domaine contient les acides aminés ou région(s) importants pour l'interaction et si le CD80 humain et les neurotrophines possèdent les mêmes sites d'interaction.

4.4 L'affinité de l'interaction de CD80-CD271

Les résultats de SPR suggèrent que l'affinité relative de l'interaction CD80-CD271 est supérieure à celle de l'interaction entre CD80 et CD28. Les différences d'affinité et la compétition entre différents ligands ont un impact important dans le déroulement de la réponse immunitaire. Par exemple, à cause de sa plus forte affinité pour le CD80 et le CD86, CTLA-4 arrive à interrompre l'interaction CD28-CD80/86 et s'oppose au signal stimulateur de CD28. Ainsi, l'interaction CD271-CD80 pourrait avoir des conséquences importantes sur le déroulement de la réponse immunitaire dans le cas où il y aurait une compétition entre le CD28 exprimé par les cellules T et le CD271 exprimé par les cellules cancéreuses pour se lier au CD80.

4.5 L'interaction de CD271 avec les DC et ses conséquences

Nos résultats *ex vivo* montrent que le CD271 ne conduit pas son effet inhibiteur à partir du CD80 exprimé par les cellules T parce que l'activation de cellules T provenant de souris CD80/CD86^{-/-} est inhibée en présence de CD271. Cependant, nous ne pouvons pas exclure un rôle possible de CD271 dans l'immunomodulation des cellules T humaines via son interaction avec le CD80. Pour pouvoir exclure cette possibilité, il faudrait utiliser des cellules T humaines au niveau desquelles l'expression de CD80 aurait été inhibée. Pour cela, on pourrait, par exemple, transfecter des cellules T humaines avec des petits ARN en épingle à cheveux ciblant le gène codant pour le CD80. Par ailleurs, à cause de l'expression importante de CD80 sur les CPA, l'interaction CD271-CD80 pourrait avoir d'autres rôles immunorégulateurs dans le système immunitaire. Il a été reporté que l'interaction CD80-CTLA-4 et CD80-CD28 donne lieu à une signalisation bidirectionnelle dans les DC, caractérisée par la production de cytokines spécifiques (191). CD28 favorise la sécrétion de l'IL-6, tandis que le CTLA-4 favorise la production d'IFN- γ par les DC (191). La modification de la balance de cytokines sécrétées par les DC provoquée par les molécules de cosignalisation CTLA-4 et CD28 a un effet important sur la prolifération des cellules T. Effectivement, l'IL-6 est un régulateur négatif de l'activité de l'IDO alors que l'IFN- γ est un inducteur de cette enzyme (191, 192). Par conséquent, l'interaction de CD271 avec le CD80 fortement exprimé par les CPA activées pourrait induire une signalisation bidirectionnelle, conduire à la production de cytokines spécifiques et permettrait donc à CD271 de réguler la fonction des cellules T via la modulation des DC. CD271 pourrait, par exemple, convertir les DC immunogéniques en DC tolérogéniques qui secrèteraient des cytokines anti-inflammatoires (Figure 14).

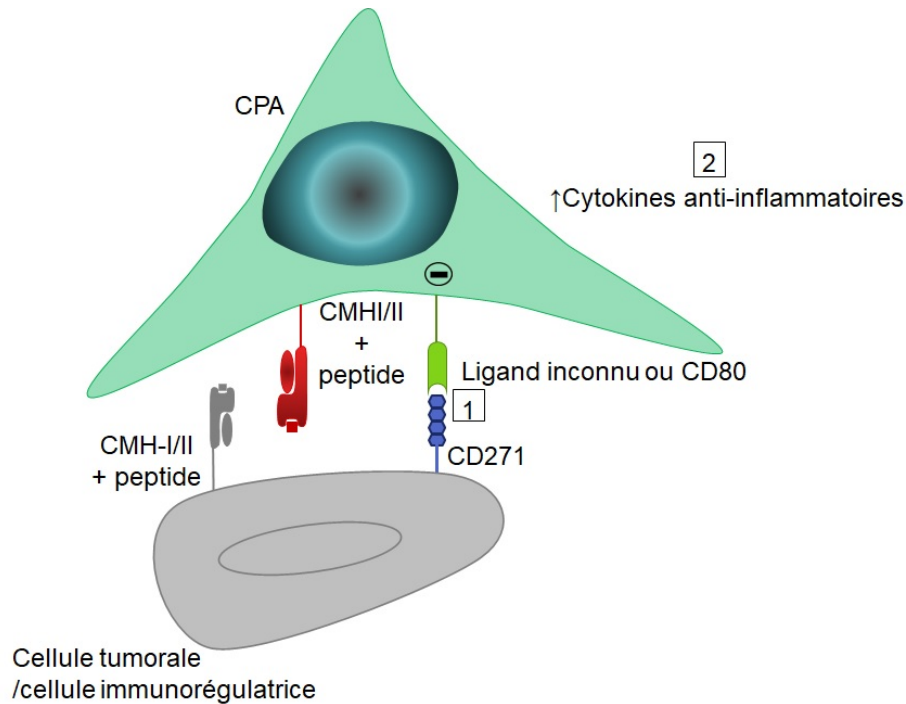


Figure 14. L'interaction entre le CD271 et son (ses) ligand(s) peut moduler la fonction des cellules présentatrices d'antigènes. La cellule présentatrice d'antigène (CPA) rencontre une cellule tumorale ou immunorégulatrice exprimant la molécule CD271. Le CD271 exprimé par ces dernières peut interagir avec le CD80 ou son ligand inconnu exprimé par la CPA (1), ce qui pourrait moduler la production de cytokine de la CPA (2).

4.6 L'interaction de CD271 avec les cellules T

Nos données suggèrent qu'il existe une interaction directe entre CD271 et son récepteur exprimé par les cellules T, puisque la présence de la protéine recombinante CD271-Fc humaine inhibe l'activation des cellules T aussi ou plus efficacement que la protéine recombinante PD-L1-Fc humaine *in vitro*. L'interaction de CD271 avec son ou ses ligand(s) inconnu exprimé(s) par les cellules T serait responsable de l'inhibition des premiers stades d'activation des cellules T, donc conséquemment de leur production de cytokines et de leur prolifération (Figure 15). Le fait que CD271 inhibe les premiers stades d'activation des cellules T, comme nous pouvons le voir avec la diminution du pourcentage de cellules exprimant CD69, le

marqueur d'activation précoce des cellules T, signifierait que le récepteur de CD271 est présent constitutivement ou que son expression est augmentée dès le début de l'activation. L'effet inhibiteur médié par CD271 très tôt dans l'activation des cellules T implique qu'au cours du déroulement d'une réponse immunitaire, si CD271 est présent au moment où les cellules T reconnaissent leur antigène, la réponse conduite par les cellules T sera interrompue précocement.

La protéine recombinante PD-L1-Fc induit également une inhibition du stade précoce d'activation des cellules T alors que ses récepteurs CD80 et PD-1 ne sont pas exprimés à de hauts niveaux par les cellules T au repos et atteignent leur expression maximale respectivement à 144h et à 48 heures suivant l'activation (91, 193). Cependant, dans la littérature il a été montré qu'une légère augmentation de l'expression de PD-1 se produisant seulement deux heures après la stimulation des cellules T, corrélait avec une diminution importante de l'expression de l'IL-2 lorsque les cellules T étaient stimulées avec des billes exprimant de l'anti-CD3/CD28/PD-1, comparativement à la stimulation avec des billes exprimant l'anti-CD3/CD28 (91). De plus, l'expression de CD80 est détectée 24 heures après l'activation des cellules T (193). Il se pourrait donc que l'expression de CD80 et la légère augmentation de PD-1 puissent expliquer le fait que dans notre activation *in vitro*, la protéine PD-L1-Fc inhibe l'activation précoce des cellules T, montrant ainsi la fiabilité du système d'activation *in vitro* que nous avons utilisé.

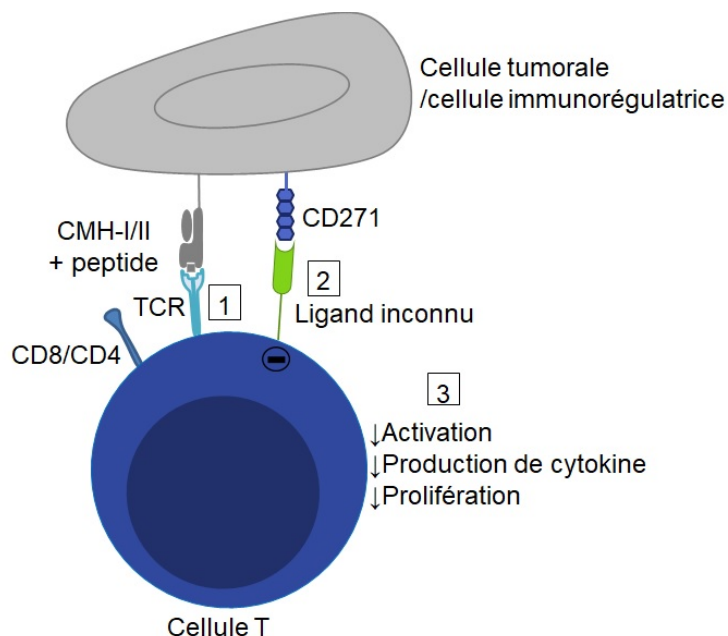


Figure 15. L'interaction entre le CD271 et son (ses) ligand(s) peut moduler la fonction des cellules T. La cellule T rencontre une cellule tumorale exprimant un antigène spécifique à son récepteur (1). Lors de cette interaction, le CD271 exprimé par la cellule tumorale peut interagir avec le CD80 (humain) ou son ligand inconnu exprimé par la cellule T (T) et inhiber sa fonction (3).

4.7 Mécanismes alternatifs d'inhibition par CD271

La modulation des DC via l'interaction CD271-CD80 ou l'induction d'un signal inhibiteur suite à l'interaction directe de CD271 avec les cellules T sont des mécanismes possibles d'inhibition de CD271. Divers autres mécanismes pourraient être utilisés par CD271 pour inhiber les cellules T. En effet, les cellules T produisent certaines neurotrophines comme le NGF qui influencent leur prolifération (194). Donc, la présence de CD271 au moment de l'activation des cellules T pourrait séquestrer ces neurotrophines et diminuer la prolifération des cellules T. Cette séquestration de neurotrophines produites par les cellules T pourrait représenter un avantage prolifératif pour certaines cellules cancéreuses exprimant CD271 et dont la

croissance est stimulée par les neurotrophines. Pour vérifier cela, on pourrait lors de la mise en culture des cellules T, ajouter un excès de différentes neurotrophines. Cette expérience permettrait de déterminer si l'ajout de neurotrophines permettrait de contrecarrer l'effet de CD271. Par ailleurs, dans la littérature, il a été reporté que les cellules Treg expriment constitutivement CD80 et que l'interaction CD80-PD-L1 augmente leur prolifération (195). L'interaction CD80-CD271 stimule aussi peut-être la prolifération des Treg. Cette hypothèse pourrait être testée en mettant en culture des Treg marqués au CFSE en présence de CD271 et en évaluant par la suite leur prolifération.

5 PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de ce projet sont des résultats qui peuvent constituer une base à partir de laquelle on pourrait approfondir d'une part la caractérisation de l'interaction entre CD271 et le CD80 humain et d'autre part le rôle de CD271 dans la modulation de la réponse immunitaire. Au niveau de la caractérisation, nous envisageons faire des compétitions de liaison à CD271 entre le CD80 humain et les neurotrophines. Par rapport au rôle de CD271 dans la modulation de la réponse immunitaire, nous comptons utiliser un modèle d'activation cellulaire plus physiologique où des cellules T murines seront activées avec des cellules présentatrices d'antigène exprimant un peptide spécifique à leur récepteur, la molécule CD271 et la molécule de costimulation CD80. Nous voulons également définir l'implication de CD271 dans le contrôle de maladies infectieuses *in vivo*, en étudiant le déroulement de la réponse immunitaire chez des souris déficientes pour CD271 préalablement infectées avec des virus ou des bactéries. Finalement, nous souhaitons déterminer comment CD271 influence le type de cytokines produites par les DC. Ces différentes expérimentations nous permettront de décrypter la fonction de CD271 dans la régulation du système immunitaire. D'un point de vue thérapeutique, ces expériences permettront également de mieux comprendre le fonctionnement de certaines cellules immunorégulatrices qui sont déjà utilisées en essais cliniques pour le traitement de diverses maladies auto-immunitaires, bien que leurs mécanismes d'immunosuppression ne soient pas encore complètement connus.

6 CONCLUSION

Le but de nos travaux de recherche était de caractériser l'interaction de CD271 avec les membres de la famille B7 et de déterminer les effets de CD271 sur la fonction des cellules T. Les résultats de la caractérisation montrent que le CD271 interagit avec des résidus conservés à travers les membres de la famille B7 humains et murins mais bien que cette interaction se fasse avec des résidus conservés, elle est restreinte au CD80 humain. En ce qui concerne les effets de CD271 sur la fonction des cellules T, les données d'activation *in vitro* que nous avons obtenus suggèrent que CD271 a un fort potentiel immunosuppresseur sur la fonction des cellules T CD4+ et CD8+. Cette suppression semble être induite par une signalisation négative de CD271 dans les cellules T suite à son interaction directe avec son ou ses récepteurs dont le CD80 ne fait pas nécessairement partie. Mais, dans un milieu d'activation plus physiologique, d'autres mécanismes pourraient participer à cette immunosuppression. En effet, puisque nous avons montré que CD271 interagit avec la molécule de costimulation CD80 humain, CD271 pourrait modifier le profil de cytokines secrétées et moduler l'activation et la fonction des cellules T.

L'expression de CD271 par certaines cellules cancéreuses et par plusieurs cellules ayant une fonction immunorégulatrice, ainsi que la spécificité de l'interaction CD271-CD80 montrent l'importance de celle-ci au niveau du fonctionnement du système immunitaire humain. Ainsi, une caractérisation plus approfondie de cette interaction pourrait éventuellement mener à la découverte d'une cible thérapeutique impliquée dans l'évasion tumorale.

7 RÉFÉRENCES

1. Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* 2005;125(4):629-37.
2. Gasteiger G, Rudensky AY. Interactions between innate and adaptive lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(9):631-9.
3. Piccinini AM, Midwood KS. Dampening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:[21 p.].
4. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):135-45.
5. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine.* 2010;28 Suppl 3:C2-13.
6. Combadiere B, Boissonnas A, Carcelain G, Lefranc E, Samri A, Bricaire F, et al. Distinct time effects of vaccination on long-term proliferative and IFN-gamma-producing T cell memory to smallpox in humans. *J Exp Med.* 2004;199(11):1585-93.
7. Jang JH, Shin HW, Lee JM, Lee HW, Kim EC, Park SH. An overview of pathogen recognition receptors for innate immunity in dental pulp. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:[12 p.].
8. Huang J, Meyer C, Zhu C. T cell antigen recognition at the cell membrane. *Mol Immunol.* 2012;52(3-4):155-64.
9. Casola S, Otipoby KL, Alimzhanov M, Humme S, Uyttersprot N, Kutok JL, et al. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol.* 2004;5(3):317-27.
10. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449(7164):819-26.
11. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009;21(4):317-37.
12. Gasteiger G, D'Ousualdo A, Schubert DA, Weber A, Bruscia EM, Hartl D. Cellular innate immunity: an old game with new players. *J Innate Immun.* 2017;9(2):111-25.
13. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(3):[20 p.].
14. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):719-30.

15. den Haan JM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett.* 2014;162(2 Pt B):103-12.
16. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(8):607-18.
17. Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(3):145-9.
18. Qi H, Egen JG, Huang AY, Germain RN. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science.* 2006;312(5780):1672-6.
19. Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol.* 1998;161(3):1313-9.
20. Guillemins M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(8):571-8.
21. Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P. Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity. *Front Immunol.* 2013;4(438):[14 p.].
22. Chung CY, Ysebaert D, Berneman ZN, Cools N. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:[8 p.].
23. Liu J, Cao X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: a comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;63:1-12.
24. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002;23(9):445-9.
25. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* 2014;33(10):1104-16.
26. Meydan C, Otu HH, Sezerman OU. Prediction of peptides binding to MHC class I and II alleles by temporal motif mining. *BMC Bioinformatics.* 2013;14 Suppl:S2-13.
27. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:443-73.

28. Gueguen M, Long EO. 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*. 1996;93(25):14692-7.
29. Wei J, Zanker D, Di Carluccio AR, Smelkinson MG, Takeda K, Seedhom MO, et al. Varied role of ubiquitylation in generating MHC class I peptide ligands. *J Immunol*. 2017;198(10):3835-45.
30. Birnbaum ME, Berry R, Hsiao YS, Chen Z, Shingu-Vazquez MA, Yu X, et al. Molecular architecture of the alphabeta T cell receptor-CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(49):17576-81.
31. Kaufmann SH. Gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2272-9.
32. Galaine J, Godet Y, Adotevi O. Pour comprendre l'activation lymphocytaire T. *Bull Cancer*. 2016;103 Suppl 1:S127-31.
33. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
34. Umeshappa CS, Xie Y, Xu S, Nanjundappa RH, Freywald A, Deng Y, et al. Th cells promote CTL survival and memory via acquired pMHC-I and endogenous IL-2 and CD40L signaling and by modulating apoptosis-controlling pathways. *PLoS One*. 2013;8(6):[14 p.].
35. Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(3):297-302.
36. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:[12 p.].
37. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*. 2006;126(1):32-41.
38. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*. 2008;15(2):251-62.
39. Kurd N, Robey EA. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol Rev*. 2016;271(1):114-26.
40. Irving BA, Alt FW, Killeen N. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science*. 1998;280(5365):905-8.
41. Shah DK, Zuniga-Pflucker JC. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol*. 2014;192(9):4017-23.

42. Yamasaki S, Saito T. Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends Immunol.* 2007;28(1):39-43.
43. Laydon DJ, Bangham CR, Asquith B. Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1675):[11 p.].
44. Rosati E, Dowds CM, Liaskou E, Henriksen EKK, Karlsen TH, Franke A. Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis. *BMC Biotechnol.* 2017;17(1):[16 p.].
45. Petrie HT, Livak F, Schatz DG, Strasser A, Crispe IN, Shortman K. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med.* 1993;178(2):615-22.
46. Padovan E, Casorati G, Dellabona P, Meyer S, Brockhaus M, Lanzavecchia A. Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science.* 1993;262(5132):422-4.
47. Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(6):[16 p.].
48. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):377-91.
49. McCaughy TM, Baldwin TA, Wilken MS, Hogquist KA. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med.* 2008;205(11):2575-84.
50. Hogquist KA, Jameson SC. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function. *Nat Immunol.* 2014;15(9):815-23.
51. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kiedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ.* 2013;37(4):273-83.
52. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science.* 1990;248(4961):1349-56.
53. Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol.* 2002;22(1):1-7.
54. Gonzalo JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol.* 2001;166(1):1-5.

55. Neefjes J, Jongma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(12):823-36.
56. Angel CE, George E, Ostrovsky LL, Dunbar PR. Comprehensive analysis of MHC-II expression in healthy human skin. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(5):363-9.
57. Artyomov MN, Lis M, Devadas S, Davis MM, Chakraborty AK. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16916-21.
58. Ryser JE, Rungger-Brandle E, Chaponnier C, Gabbiani G, Vassalli P. The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells shows high motility and polarization of actin, but not myosin. *J Immunol*. 1982;128(3):1159-62.
59. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999;285(5425):221-7.
60. Saito T, Yokosuka T, Hashimoto-Tane A. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS Lett*. 2010;584(24):4865-71.
61. Valitutti S, Coombs D, Dupre L. The space and time frames of T cell activation at the immunological synapse. *FEBS Lett*. 2010;584(24):4851-7.
62. Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):257-69.
63. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):227-42.
64. Lenschow DJ, Su GH, Zuckerman LA, Nabavi N, Jellis CL, Gray GS, et al. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(23):11054-8.
65. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med*. 1994;180(2):631-40.
66. Sanchez-Lockhart M, Rojas AV, Fettis MM, Bauserman R, Higa TR, Miao H, et al. T cell receptor signaling can directly enhance the avidity of CD28 ligand binding. *PLoS One*. 2014;9(2):[12 p.].

67. Marinari B, Costanzo A, Marzano V, Piccolella E, Tuosto L. CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-kappaB subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6098-103.
68. Kong KF, Yokosuka T, Canonigo-Balancio AJ, Isakov N, Saito T, Altman A. A motif in the V3 domain of the kinase PKC-theta determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1105-12.
69. Boomer JS, Green JM. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(8):[20 p.].
70. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*. 2016;44(5):973-88.
71. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *J Exp Med*. 2015;212(9):1345-60.
72. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev*. 2009;229(1):5-11.
73. Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol*. 2009;21(5):265-72.
74. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(3):333-40.
75. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, et al. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 1999;162(6):3256-62.
76. Lichtman AH, Chin J, Schmidt JA, Abbas AK. Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(24):9699-703.
77. Tsai HF, Hsu PN. Cancer immunotherapy by targeting immune checkpoints: mechanism of T cell dysfunction in cancer immunity and new therapeutic targets. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):[8 p.].
78. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106.
79. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.

80. Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant.* 2012;12(10):2575-87.
81. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev.* 2008;224:166-82.
82. Li Y, Li F, Jiang F, Lv X, Zhang R, Lu A, et al. A mini-review for cancer immunotherapy: molecular understanding of PD-1/PD-L1 pathway and translational blockade of immune checkpoints. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):[22 p.].
83. Odorizzi PM, Wherry EJ. Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. *J Immunol.* 2012;188(7):2957-65.
84. Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology.* 2000;101(2):169-77.
85. Eyre TA, Collins GP. Immune checkpoint inhibition in lymphoid disease. *Br J Haematol.* 2015;170(3):291-304.
86. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol.* 2004;172(7):4100-10.
87. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science.* 2017;355(6332):1428-33.
88. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front Pharmacol.* 2017;8(561):[15 p.].
89. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 2009;229(1):114-25.
90. Zappasodi R, Merghoub T, Wolchok JD. Emerging concepts for immune checkpoint blockade-based combination therapies. *Cancer Cell.* 2018;33(4):581-98.
91. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol.* 2004;173(2):945-54.
92. Raue HP, Slifka MK. Pivotal advance: CTLA-4+ T cells exhibit normal antiviral functions during acute viral infection. *J Leukoc Biol.* 2007;81(5):1165-75.

93. Frelau A, Pracht M, Le Sourd S, Lespagnol A, Corre R, Menard C, et al. Biomarqueurs prédictifs de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immuns. *Bull Cancer* [En ligne]. 2018 [Cité le 05 Avril 2018]:[12 p.]. Disponible: <https://doi.org/0.1016/j.bulcan.2017.10.031>.
94. Zelinskyy G, Myers L, Dietze KK, Gibbert K, Roggendorf M, Liu J, et al. Virus-specific CD8+ T cells upregulate programmed death-1 expression during acute friend retrovirus infection but are highly cytotoxic and control virus replication. *J Immunol*. 2011;187(7):3730-7.
95. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999;5(12):1365-9.
96. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):[11 p.].
97. Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol Rev*. 2011;241(1):180-205.
98. Bakhru P, Su MA. Estrogen turns down "the AIRE". *J Clin Invest*. 2016;126(4):1239-41.
99. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol*. 2017;18(7):716-24.
100. Zhang Q, Vignali DA. Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in autoimmunity. *Immunity*. 2016;44(5):1034-51.
101. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3(5):541-7.
102. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*. 1995;270(5238):985-8.
103. Wang HB, Shi FD, Li H, Chambers BJ, Link H, Ljunggren HG. Anti-CTLA-4 antibody treatment triggers determinant spreading and enhances murine myasthenia gravis. *J Immunol*. 2001;166(10):6430-6.

104. Luhder F, Hoglund P, Allison JP, Benoist C, Mathis D. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 1998;187(3):427-32.
105. Perrin PJ, Maldonado JH, Davis TA, June CH, Rucke MK. CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 1996;157(4):1333-6.
106. Lo B, Fritz JM, Su HC, Uzel G, Jordan MB, Lenardo MJ. CHAI and LATAIE: new genetic diseases of CTLA-4 checkpoint insufficiency. *Blood.* 2016;128(8):1037-42.
107. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science.* 2015;349(6246):436-40.
108. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3384-91.
109. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16-25.
110. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015;35:S185-98.
111. Cali B, Molon B, Viola A. Tuning cancer fate: the unremitting role of host immunity. *Open Biol.* 2017;7(4):[12 p.].
112. Ventola CL. Cancer immunotherapy, Part 1: current strategies and agents. *Pharmacy and Therapeutics Journal.* 2017;42(6):375-83.
113. Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(8):493-502.
114. Vasaturo A, Di Blasio S, Peeters DG, de Koning CC, de Vries JM, Figdor CG, et al. Clinical implications of co-inhibitory molecule expression in the tumor microenvironment for DC vaccination: A game of stop and go. *Front Immunol.* 2013;4(417):[14 p.].
115. Chen X, Du Y, Hu Q, Huang Z. Tumor-derived CD4⁺CD25⁺regulatory T cells inhibit dendritic cells function by CTLA-4. *Pathol Res Pract.* 2017;213(3):245-9.

116. Karachaliou N, Cao MG, Teixido C, Viteri S, Morales-Espinosa D, Santarpia M, et al. Understanding the function and dysfunction of the immune system in lung cancer: the role of immune checkpoints. *Cancer Biol Med.* 2015;12(2):79-86.
117. Wu AA, Drake V, Huang HS, Chiu S, Zheng L. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncoimmunology.* 2015;4(7):[14 p.].
118. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 2007;27(1):111-22.
119. Duraiswamy J, Freeman GJ, Coukos G. Therapeutic PD-1 pathway blockade augments with other modalities of immunotherapy T-cell function to prevent immune decline in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2013;73(23):6900-12.
120. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2009;206(13):3015-29.
121. Wang Q, Liu F, Liu L. Prognostic significance of PD-L1 in solid tumor: an updated meta-analysis. *Medicine.* 2017;96(18):[12 p.].
122. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Targeting T Cell co-receptors for cancer therapy. *Immunity.* 2016;44(5):1069-78.
123. Wang L, Heng X, Lu Y, Cai Z, Yi Q, Che F. Could B7-H4 serve as a target to activate anti-cancer immunity? *Int Immunopharmacol.* 2016;38:97-103.
124. Podojil JR, Miller SD. Potential targeting of B7-H4 for the treatment of cancer. *Immunol Rev.* 2017;276(1):40-51.
125. Harris SJ, Brown J, Lopez J, Yap TA. Immuno-oncology combinations: raising the tail of the survival curve. *Cancer Biol Med.* 2016;13(2):171-93.
126. Blank CU, Enk A. Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies. *Int Immunol.* 2015;27(1):3-10.
127. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med.* 2013;210(9):1695-710.

128. Robert L, Tsoi J, Wang X, Emerson R, Homet B, Chodon T, et al. CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res.* 2014;20(9):2424-32.
129. Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, Zhao Y, Anang NAS, Andrews MC, et al. Distinct cellular mechanisms underlie anti-CTLA-4 and anti-PD-1 checkpoint blockade. *Cell.* 2017;170(6):1120-33.
130. Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol.* 2017;47(5):765-79.
131. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2521-32.
132. Spain L, Diem S, Larkin J. Management of toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2016;44:51-60.
133. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy-inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res.* 2012;18(24):6580-7.
134. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1889-94.
135. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2017;377(14):1345-56.
136. O'Day SJ, Maio M, Chiarion-Sileni V, Gajewski TF, Pehamberger H, Bondarenko IN, et al. Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol.* 2010;21(8):1712-7.
137. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-23.
138. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Konishi I. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int J Clin Oncol.* 2016;21(3):462-73.
139. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2006-17.

140. Manning L, Nemunaitis J. Harnessing the immune response to target tumors [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Res*. 2017;6:[8 p.].
141. Abdel-Wahab N, Shah M, Suarez-Almazor ME. Adverse events associated with immune checkpoint blockade in patients with cancer: a systematic review of case reports. *PLoS One*. 2016;11(7):[15 p.].
142. Philips GK, Atkins M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Int Immunol*. 2015;27(1):39-46.
143. Tarhini A. Immune-mediated adverse events associated with ipilimumab CTLA-4 blockade therapy: the underlying mechanisms and clinical management. *Scientifica*. 2013;2013:[19 p.].
144. Ott PA, Hodi FS, Kaufman HL, Wigginton JM, Wolchok JD. Combination immunotherapy: a road map. *J Immunother Cancer*. 2017;5:[15 p.].
145. Antonia SJ, Vansteenkiste JF, Moon E. Immunotherapy: beyond anti-PD-1 and anti-PD-L1 therapies. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2016;35:[9 p.].
146. Mocellin S, Benna C, Pilati P. Coinhibitory molecules in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(2):147-61.
147. Maleki Vareki S, Garrigos C, Duran I. Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;116:116-24.
148. Manson G, Norwood J, Marabelle A, Kohrt H, Houot R. Biomarkers associated with checkpoint inhibitors. *Ann Oncol*. 2016;27(7):1199-206.
149. Li J, Ni L, Dong C. Immune checkpoint receptors in cancer: redundant by design? *Curr Opin Immunol*. 2017;45:37-42.
150. Baldwin AN, Shooter EM. Disulfide mutants of the binding domain of the rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J Biol Chem*. 1994;269(15):11456-61.
151. Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Res*. 2016;5:[9 p.].
152. Zampieri N, Chao MV. Mechanisms of neurotrophin receptor signalling. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 4):607-11.
153. Singh KK, Park KJ, Hong EJ, Kramer BM, Greenberg ME, Kaplan DR, et al. Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR-dependent axon degeneration. *Nat Neurosci*. 2008;11(6):649-58.

154. Reis-Filho JS, Steele D, Di Palma S, Jones RL, Savage K, James M, et al. Distribution and significance of nerve growth factor receptor (NGFR/p75NTR) in normal, benign and malignant breast tissue. *Mod Pathol.* 2006;19(2):307-19.
155. Procaccini C, Pucino V, De Rosa V, Marone G, Matarese G. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front Immunol.* 2014;5:143.
156. Jiang Y, Chen G, Zheng Y, Lu L, Wu C, Zhang Y, et al. TLR4 signaling induces functional nerve growth factor receptor p75NTR on mouse dendritic cells via p38MAPK and NF-kappa B pathways. *Mol Immunol.* 2008;45(6):1557-66.
157. Lambiase A, Micera A, Sgrulletta R, Bonini S, Bonini S. Nerve growth factor and the immune system: old and new concepts in the cross-talk between immune and resident cells during pathophysiological conditions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4(5):425-30.
158. Vega JA, Garcia-Suarez O, Hannestad J, Perez-Perez M, Germana A. Neurotrophins and the immune system. *J Anat.* 2003;203(1):1-19.
159. Garcia-Suarez O, Germana A, Hannestad J, Ciriaco E, Silos-Santiago I, Germana G, et al. Involvement of the NGF receptors (Trka and p75Ntr) in the development and maintenance of the thymus. *Ital J Anat Embryol.* 2001;106(2 Suppl 1):279-85.
160. Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Bonini S, Starace G, D'Elia MM, et al. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(3):408-14.
161. Jiang Y, Chen G, Zhang Y, Lu L, Liu S, Cao X. Nerve growth factor promotes TLR4 signaling-induced maturation of human dendritic cells in vitro through inducible p75NTR 1. *J Immunol.* 2007;179(9):6297-304.
162. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162-74.
163. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.* 2016;7:[11 p.].
164. Alvarez-Viejo M, Menendez-Menendez Y, Otero-Hernandez J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells.* 2015;7(2):470-6.
165. Mochizuki M, Tamai K, Imai T, Sugawara S, Ogama N, Nakamura M, et al. CD271 regulates the proliferation and motility of hypopharyngeal cancer cells. *Sci Rep.* 2016;6:[11 p.].

166. Furuta J, Inozume T, Harada K, Shimada S. CD271 on melanoma cell is an IFN-gamma-inducible immunosuppressive factor that mediates downregulation of melanoma antigens. *J Invest Dermatol.* 2014;134(5):1369-77.
167. Li S, Yue D, Chen X, Wang L, Li J, Ping Y, et al. Epigenetic regulation of CD271, a potential cancer stem cell marker associated with chemoresistance and metastatic capacity. *Oncol Rep.* 2015;33(1):425-32.
168. Redmer T, Welte Y, Behrens D, Fichtner I, Przybilla D, Wruck W, et al. The nerve growth factor receptor CD271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells. *PLoS One.* 2014;9(5):[16 p.].
169. Dolle L, Adriaenssens E, El Yazidi-Belkoura I, Le Bourhis X, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004;4(6):463-70.
170. Kust B, Mantingh-Otter I, Boddeke E, Copray S. Deficient p75 low-affinity neurotrophin receptor expression does alter the composition of cellular infiltrate in experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol.* 2006;174(1-2):92-100.
171. Ramani SR, Tom I, Lewin-Koh N, Wranik B, Depalatis L, Zhang J, et al. A secreted protein microarray platform for extracellular protein interaction discovery. *Anal Biochem.* 2012;420(2):127-38.
172. Dilek N, Poirier N, Hulin P, Coulon F, Mary C, Ville S, et al. Targeting CD28, CTLA-4 and PD-L1 costimulation differentially controls immune synapses and function of human regulatory and conventional T-cells. *PLoS One.* 2013;8(12):[14 p.].
173. Welcher AA, Bitler CM, Radeke MJ, Shooter EM. Nerve growth factor binding domain of the nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(1):159-63.
174. Jin Z, Tietjen I, Bu L, Liu-Yesucevitz L, Gaur SK, Walsh CA, et al. Disease-associated mutations affect GPR56 protein trafficking and cell surface expression. *Hum Mol Genet.* 2007;16(16):1972-85.
175. Runker AE, Bartsch U, Nave KA, Schachner M. The C264Y missense mutation in the extracellular domain of L1 impairs protein trafficking in vitro and in vivo. *J Neurosci.* 2003;23(1):277-86.
176. Valastyan JS, Lindquist S. Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. *Dis Model Mech.* 2014;7(1):9-14.

177. Fargeas CA, Truneh A, Reddy M, Hurle M, Sweet R, Sekaly RP. Identification of residues in the V domain of CD80 (B7-1) implicated in functional interactions with CD28 and CTLA4. *J Exp Med*. 1995;182(3):667-75.
178. Lehnert C, Weiswange M, Jeremias I, Bayer C, Grunert M, Debatin KM, et al. TRAIL-receptor costimulation inhibits proximal TCR signaling and suppresses human T cell activation and proliferation. *J Immunol*. 2014;193(8):4021-31.
179. Huang SC, Tsai HF, Tzeng HT, Liao HJ, Hsu PN. Lipid raft assembly and Lck recruitment in TRAIL costimulation mediates NF-kappaB activation and T cell proliferation. *J Immunol*. 2011;186(2):931-9.
180. Roberts NJ, Zhou S, Diaz LA, Jr., Holdhoff M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget*. 2011;2(10):739-51.
181. Toomer KH, Chen Z. Autoimmunity as a double agent in tumor killing and cancer promotion. *Front Immunol*. 2014;5:[14 p.].
182. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*. 2014;192(12):5451-8.
183. Tokmakov AA, Kurotani A, Takagi T, Toyama M, Shirouzu M, Fukami Y, et al. Multiple post-translational modifications affect heterologous protein synthesis. *J Biol Chem*. 2012;287(32):27106-16.
184. Murphy KM, Nelson CA, Sedy JR. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(9):671-81.
185. Sorensen P, Kussmann M, Rosen A, Bennett KL, Thrige Dda G, Uvebrant K, et al. Identification of protein-protein interfaces implicated in CD80-CD28 costimulatory signaling. *J Immunol*. 2004;172(11):6803-9.
186. Freeman GJ, Gray GS, Gimmi CD, Lombard DB, Zhou LJ, White M, et al. Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J Exp Med*. 1991;174(3):625-31.
187. Girard T, Gaucher D, El-Far M, Breton G, Sekaly RP. CD80 and CD86 IgC domains are important for quaternary structure, receptor binding and co-signaling function. *Immunol Lett*. 2014;161(1):65-75.

188. Peach RJ, Bajorath J, Naemura J, Leytze G, Greene J, Aruffo A, et al. Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J Biol Chem.* 1995;270(36):21181-7.
189. Yan H, Chao MV. Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J Biol Chem.* 1991;266(18):12099-104.
190. Shamovsky IL, Ross GM, Riopelle RJ, Weaver DF. The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci.* 1999;8(11):2223-33.
191. Orabona C, Grohmann U, Belladonna ML, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, et al. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat Immunol.* 2004;5(11):1134-42.
192. Von Bubnoff D, Scheler M, Wilms H, Fimmers R, Bieber T. Identification of IDO-positive and IDO-negative human dendritic cells after activation by various proinflammatory stimuli. *J Immunol.* 2011;186(12):6701-9.
193. Sun ZW, Qiu YH, Shi YJ, Tao R, Chen J, Ge Y, et al. Time courses of B7 family molecules expressed on activated T-cells and their biological significance. *Cell Immunol.* 2005;236(1-2):146-53.
194. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Nerve growth factor: a key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(11):3243-52.
195. Yi T, Li X, Yao S, Wang L, Chen Y, Zhao D, et al. Host APCs augment in vivo expansion of donor natural regulatory T cells via B7H1/B7.1 in allogeneic recipients. *J Immunol.* 2011;186(5):2739-49.

8 ANNEXE

8.1 Formulaire de consentement

Centre intégré
universitaire de santé
et de services sociaux
de l'Est-de-
l'Île-de-Montréal



Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415, boulevard de l'Assomption
Montréal (Québec) H1T 2M4

FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT

Participation à la banque de cellules de l'HMR

Consentement général principal – don rémunéré

Gestionnaire et responsable de la banque : Docteur Denis-Claude Roy, hématologue et chercheur au centre de recherche HMR.

INSTALLATION

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

(HMR) 5415, boul. de

l'Assomption

Montréal, Qc, H1T 2M4

PRÉAMBULE

Nous vous invitons à participer à la banque de cellules de l'HMR (qui comprend aussi leur milieu) en faisant le don de votre sang, moelle ou biopsie osseuse. Vos échantillons seront

entreposés dans un laboratoire pour utilisation en recherche actuelle ou future.

Les recherches qui pourront être effectuées sur vos échantillons ne vous aideront probablement pas directement. Elles pourront cependant aider des personnes qui ont un cancer ou d'autres maladies du système sanguin et immunitaire, ou des maladies pour lesquelles une réparation des tissus serait utile (problèmes oculaires, cardiaques, pulmonaires, génito-urinaires, gastro-intestinaux, neurologiques, musculo-squelettiques, muco-cutanés ou autres). La lecture de ce formulaire vous apportera tous les renseignements relatifs à votre participation à cette banque.

BUT DE LA BANQUE

En étudiant les échantillons et données de la banque, nous croyons pouvoir faire des progrès dans nos recherches et améliorer notre compréhension des cancers et des désordres du système sanguin et immunitaire, ainsi que des cellules normales et des maladies où une réparation de tissus serait utile.

Les échantillons serviront aux recherches visant à mieux comprendre les causes, le fonctionnement, l'évolution et les facteurs pronostiques de ces maladies ou les mécanismes qui les caractérisent et étudier de nouvelles approches de diagnostic et de prévention, ainsi que développer de nouveaux traitements afin d'améliorer la condition des patients ou de parvenir à les guérir. Ces échantillons seront constitués notamment de sang, moelle ou biopsie osseuse.

TYPES D'ANALYSES

En bénéficiant de vos échantillons, les chercheurs pourront étudier les cellules et leur milieu par des méthodes biologiques, biochimiques, cellulaires et moléculaires. Ceci comprend l'étude d'informations génétiques (ADN), la production d'anticorps et la prolongation de la durée de vie de certaines cellules.

NATURE DE VOTRE PARTICIPATION

La participation à cette banque implique la collecte d'échantillons biologiques et l'autorisation d'accès à votre dossier médical.

Que vous soyez malade ou non, vous pourrez être examiné par un médecin et avoir des examens sanguins (formule sanguine complète et tests biochimiques) afin de vérifier si vous pouvez participer à cette procédure (moelle osseuse ou apherèse). Si nous découvrons une anomalie aux tests de laboratoire, vous serez référé à un médecin de l'HMR.

DESCRIPTION DES PROCÉDURES

Le prélèvement des cellules de moelle osseuse est réalisé au niveau de l'os de la fesse. Il implique une désinfection locale suivie d'injection d'anesthésique au niveau du site du prélèvement. Une aiguille est ensuite insérée dans l'os de la fesse et environ 2-3 cuillerées à soupe sont aspirées (aspiration de moelle osseuse).

La biopsie osseuse s'effectue de la même façon mais implique le prélèvement d'un petit morceau d'os avec une aiguille. Une compresse est ensuite posée, qui devrait être enlevée 48 heures plus tard.

Le prélèvement des cellules sanguines par apherèse se fait à l'aide d'un appareil qui sépare les cellules, selon un principe de centrifugation. On doit alors vous installer deux cathéters dans les veines du pli du coude de chaque bras. Le séparateur de cellules qui filtre votre sang, retourne dans votre système toutes les cellules sanguines sauf les cellules et leur milieu désirés. La procédure dure environ 1-3 heures. Une fois les cellules de votre sang avec leur plasma prélevées, elles ne seront utilisées qu'à des fins expérimentales.

COMPENSATION FINANCIÈRE

Veillez indiquer à quelle procédure vous participerez et à titre de compensation pour les dépenses encourues et pour le temps consacré à ce don, vous recevrez la somme de :

- Sang, vous recevrez : 2-6 tubes : 20\$, 7-15 tubes : 40\$, 16-20 tubes : 60\$
- Aspiration de moelle, vous recevrez : 100\$
- Biopsie osseuse, vous recevrez : 100\$
- Apherèse, vous recevrez : 300\$

GESTION DES ÉCHANTILLONS ET DES DONNÉES ASSOCIÉES

Avant que les échantillons ne puissent être utilisés, toute information vous identifiant sera retirée et remplacée par un code alphanumérique. Les échantillons recueillis pourront être utilisés soit lors de leur obtention, soit congelés pour un usage ultérieur, soit immortalisées et seront conservés pour une période indéterminée à l'HMR.

Les données associées à ces échantillons (type d'échantillon le nombre de cellules prélevées, le sexe le groupe ethnique, le diagnostic, etc.) seront conservées en respectant les règles de confidentialité. Tout renseignement associé à vos échantillons sera gardé de manière sécuritaire au laboratoire de l'HMR et dans des fichiers informatiques sécurisés.

Des informations de votre dossier médical peuvent parfois être nécessaires aux chercheurs pour leur permettre d'analyser les résultats de leur recherche. Celles-ci comprennent votre âge, votre sexe, votre groupe ethnique, votre état de santé ou les conditions reliées à votre maladie. Ces données seront fournies aux chercheurs qui les demandent et ne porteront aucun élément qui pourra vous identifier.

AVANTAGES

Il est probable que vous ne bénéficierez pas directement de la recherche effectuée avec vos échantillons, cependant elle pourra aider dans le futur d'autres personnes malades.

RISQUES ET INCONVÉNIENTS

Dans le cas présent, le responsable de la banque a pris des mesures strictes en matière de confidentialité et en matière de respect de la vie privée. Il s'engage à ne divulguer aucune information, ni à votre famille ni à personne sans votre consentement écrit, à moins que ce ne soit requis par la loi.

Un des risques associés au projet de recherche est lié à la divulgation des résultats ou de votre participation à des tiers. Comme pour toute information médicale et projet de recherche, votre

participation à la recherche pourrait affecter vos chances d'assurabilité (assurance-vie, invalidité ou santé) ou d'obtenir certains emplois, de même que celles de votre famille

Dans le cas présent, le responsable de la banque a mis en place des mesures physiques et informatiques strictes pour protéger la confidentialité des données et des échantillons biologiques vous concernant. Tous les efforts seront déployés pour protéger votre vie privée et assurer votre confidentialité, tel que décrit dans la section «Confidentialité».

Les risques associés au prélèvement du sang, de la moelle osseuse ou de la biopsie osseuse sont le risque de saignement, d'ecchymose (bleu), d'infection, de malaises, d'étourdissements, et de douleur au site de prélèvement. Pour ce qui est de la lymphophrèse, un certain degré d'inconfort pourrait survenir lors de l'installation des cathéters veineux, et il pourrait y avoir formation d'ecchymose au site. À cause d'un anticoagulant que l'on doit administrer pour éviter les thromboses (caillots) dans le système de la centrifugeuse, vous pouvez avoir des effets indésirables tels des engourdissements dans les doigts, dans les pieds et au niveau des lèvres. Ces symptômes sont occasionnés par une chute du calcium et ils disparaissent rapidement lors de l'administration de calcium intraveineux pendant la procédure. Vous pouvez également éprouver des effets secondaires comme des nausées, des vomissements, ou une baisse de pression. Ces symptômes sont habituellement traitables et contrôlables. Le prélèvement de cellules par sang périphérique se fait en externe, et ne nécessite ni anesthésie locale ou générale.

PARTICIPATION VOLONTAIRE ET DROIT DE RETRAIT

Votre contribution à la banque est tout à fait volontaire. Vous êtes libre d'accepter ou de refuser d'y contribuer et la qualité des soins qui vous sont accordés ne dépend en aucune façon de votre participation à ce projet.

Vous pouvez (ou votre représentant légal), en tout temps, retirer vos échantillons pour toutes utilisations futures de la banque de cellules sans pénalité. Vous pouvez communiquer avec le responsable de la banque à cet effet. Vos échantillons (y compris les informations associées) seront détruits selon les procédures régulières du laboratoire où ils sont conservés. Vous

obtiendrez une confirmation écrite de la destruction des échantillons.

CONFIDENTIALITÉ

Les données en elles-mêmes ou combinées aux données provenant d'autres projets, pourront être partagées avec les organismes réglementaires canadiens ou d'autres pays ou avec les partenaires commerciaux du chercheur. Ce transfert d'information implique que vos données pourraient être transmises dans d'autres pays que le Canada. Cependant, le chercheur respectera les règles de confidentialité en vigueur au Québec et au Canada, et ce, dans tous les pays. Ces données seront conservées pendant une période indéterminée par le chercheur responsable.

Vos échantillons seront entreposés au laboratoire de l'HMR (à accès limité et sécurisé). Les échantillons utilisés à des fins de recherche ne porteront pas votre nom et seront codés de façon alphanumérique.

Votre identité et ce code unique seront consignés dans un registre tenu par le responsable de la banque. Seul le responsable de la banque et ses collaborateurs immédiats pourront faire le lien entre vous et vos échantillons/données.

Des personnes mandatées par le comité d'éthique de la recherche, par l'établissement, par des commanditaires ou subventionnaires d'études, ou par des organismes réglementaires peuvent visiter la banque de cellules de l'HMR à des fins de surveillance et de contrôle.

Si des informations doivent être recueillies de votre dossier médical, ceci sera fait en respectant les règles de confidentialité. Elles seront associées au même code que celui de votre échantillon biologique et seront fournies aux chercheurs qui en font la demande pour l'analyse des résultats de ses recherches. Toutes les données seront sécurisées et accessibles seulement au responsable de la banque et son équipe.

Votre participation et les résultats de la recherche ne seront pas inscrits dans votre dossier médical et aucune information nominative ne sera transmise aux autres chercheurs qui ne

sauront donc pas qui vous êtes. Si des données étaient publiées, l'anonymat sera conservé. Les résultats de l'ensemble de ces recherches ne vous seront communiqués que si vous en faites la demande écrite. Cependant, aucun résultat de l'analyse individuelle de vos échantillons ne vous sera transmis.

RÈGLES D'UTILISATION

Le responsable de la banque fournira les échantillons et les données aux chercheurs qui en feront la demande, à condition que leurs projets reçoivent une évaluation positive du responsable de la banque ainsi que du comité d'éthique de la recherche de l'HMR ou de leur établissement, et le responsable de la banque émettra au demandeur une lettre d'autorisation de l'utilisation de la banque. Il pourra s'agir de chercheurs canadiens ou étrangers, qui effectuent leurs recherches ici ou ailleurs dans le monde.

POLITIQUE DE LA BANQUE

Une politique encadre la gestion de la banque. Celle-ci est révisée régulièrement pour répondre aux exigences médicales, légales et éthiques en vigueur. Elle est disponible aux personnes qui en font la demande.

CONSIDÉRATIONS FINANCIÈRES

Les projets de recherche qui utiliseraient les échantillons et les données pourront être subventionnés soit par des organisations gouvernementales, des organisations charitables ou des entreprises privées. La banque de cellules de l'HMR est sans but lucratif. Le responsable de la banque n'en retire aucun bénéfice économique.

Dans la mesure où la banque poursuit des objectifs académiques, il n'y aura pas de vente de matériel biologique ou de données. Par contre, il est possible que l'utilisation de la banque par des chercheurs - utilisateurs contribue à la production de résultats de recherche qui pourraient donner naissance à des produits, applications, et brevets lesquels pourraient être commercialisés; le cas échéant, vous ne recevrez aucune compensation financière ou autre.

INDEMNISATION

Si vous deviez subir quelque préjudice que ce soit par suite de toute procédure reliée à votre contribution à cette banque, vous recevrez tous les soins de santé et les médicaments nécessaires dans le cadre des services couverts en vertu de la Loi sur l'assurance maladie du Québec et par le régime d'assurance-soins de santé et médicaments. En acceptant de participer à la banque et en signant le présent formulaire, vous ne renoncez à aucun de vos droits garantis par la loi ni ne libérez le responsable de la banque de ses responsabilités légales et professionnelles.

QUESTIONS

Si vous désirez de plus amples informations sur la banque, vous pouvez contacter le docteur Denis Claude Roy, responsable de la banque de cellules de l'HMR, au (514) 252-3404, ou le(la) coordonnateur(trice) de recherche clinique au (514) 252-3400 poste 4681.

SURVEILLANCE DES ASPECTS ÉTHIQUES

Le comité d'éthique de la recherche de l'HMR a approuvé ce projet de mise en banque et en assure le suivi. De plus, il approuvera au préalable toute révision et toute modification apportée au formulaire d'information et de consentement et à la politique de banque. Pour le joindre : (514) 252-3400 poste 5708.

Pour toute question concernant vos droits à titre de participant à ce projet de recherche ou si vous avez une plainte ou un commentaire à formuler, vous pouvez contacter la commissaire aux plaintes et à la qualité du CIUSSS de l'Est-de-l'Ile-de-Montréal au numéro (514) 252-3400 poste 3510.

CONSENTEMENT

J'ai pris connaissance du formulaire d'information et de consentement intitulé « *Participation à la banque de cellules de l'HMR* » J'ai reçu des réponses satisfaisantes à toutes mes questions. Je consens volontairement à participer à cette banque. Je comprends que je suis libre de retirer mon consentement à n'importe quel moment, sans préjudice d'aucune sorte. Une copie signée de ce formulaire de consentement m'a été remise.

_____ Signature du sujet	_____ NOM (Caractères d'imprimerie)	_____ DATE
_____ Signature du témoin	_____ NOM (Caractères d'imprimerie)	_____ DATE

Engagement du responsable de la banque

Je m'engage à respecter toutes les clauses du présent consentement.

_____ Signature du responsable de la banque	_____ NOM (Caractères d'imprimerie)	_____ DATE
---	--	---------------

8.2 Séquence d'amorces

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée du CD271 humain

Gène	Séquence (5'-3')
<i>CD271</i> (C1)	F-ACACACACAGCGGTGAGGCCGCCAAAGCCTGCAACCTGG R-CCAGGTTGCAGGCTTTGGCGGCCTCACCGCTGTGTGTGT
<i>CD271</i> (C2)	F-GCGACCGAGCCGGCCAAGCCGGCCACCGAGTGCGT R-ACGCACTCGGTGGCCGGCTTGGCCGGCTCGGTTCGC
<i>CD271</i> (C3)	F-CTGCGAGGCGGCCCGCGTGGCCGAGGCGGGC R-GCCCGCCTCGGCCACGCGGGCCGCCTCGCAG
<i>CD271</i> (C4)	F-CACGTGGACCCGGCCCTGCCCGCCACCGTGTGCGA R-TCGCACACGGTGGCGGGCAGGGCCGGGTCCACGTG

Les amorces sens sont représentées par la lettre F (forward) et les amorces anti-sens sont représentées par la lettre R (reverse). C1 à C4 : gènes dont les mutations ont été introduites respectivement dans les domaines riches en cystéine 1, 2, 3 et 4.