



# Les mécanismes moléculaires de résistance des cellules de mélanome à l'attaque des lymphocytes T cytotoxiques à la synapse immunologique

Liza Filali

## ► To cite this version:

Liza Filali. Les mécanismes moléculaires de résistance des cellules de mélanome à l'attaque des lymphocytes T cytotoxiques à la synapse immunologique. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30280 . tel-03174888

**HAL Id: tel-03174888**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03174888>**

Submitted on 19 Mar 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par  
**Liza FILALI**

Le 19 décembre 2019

**Les mécanismes moléculaires de résistance des cellules de  
mélanome à l'attaque des lymphocytes T cytotoxiques à la  
synapse immunologique**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Unité de recherche :  
**CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse**

Thèse dirigée par  
**Salvatore VALITUTTI et Laurence LAMANT**

Jury

M. Daniel Speiser, Rapporteur  
M. Yann Leverrier, Rapporteur  
Mme Camille Laurent, Examinatrice  
M. Salvatore Valitutti, Directeur de thèse



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Tout d'abord les rapporteurs, Pr. Daniel Speiser et Dr. Yann Leverrier c'est un honneur pour moi d'avoir l'opportunité d'échanger avec vous sur ce projet et de pouvoir bénéficier de vos conseils. Je remercie également Pr. Camille Laurent d'avoir accepté d'intégrer mon jury de thèse et j'ai hâte de pouvoir profiter de votre expertise et avis sur ce projet.

Ma liste de personnes à remercier est longue, vous êtes nombreux à avoir participé de près ou de loin à ces 4 années de travail. Et cette thèse c'est aussi une énorme aventure humaine donc tant pis si c'est un peu long.

**Salvatore**, merci de m'avoir accepté dans l'équipe, je pense que vous vous souvenez que je tenais particulièrement à l'intégrer. J'ai beaucoup appris à vos côtés, en sciences bien sur mais surtout sur moi. Vous m'avez toujours poussé m'améliorer notamment en m'apprenant à mettre en avant les résultats qui doivent l'être et les compétences de chacun. Vous avez toujours cherché à me faire comprendre ce qu'il fallait que j'améliore si je voulais réussir. Donc je tenais à vous remercier spécialement pour ça. De vous je retiendrai bien entendu qu'il faut « laisser sa chance à la manip de fonctionner ». Je vous remercie également de m'avoir montré certains « à côté » du métier notamment certaines écritures de projet, je pense que ça m'a également beaucoup appris sur le métier en général et surtout sur comment retranscrire au mieux des idées. Merci pour tous ces moments d'échanges scientifiques, particulièrement les dernières années de ma thèse, je retiendrai vraiment ces moments où chacun enrichissant l'idée de l'autre on parvenait à des idées passionnantes, géniales et parfois un peu folles. Merci également pour votre fantaisie (ps : je suis ravie de ne jamais avoir été vraiment viré !). J'ai donc énormément appris durant cette thèse, sur beaucoup de choses différentes, et vous y avez énormément contribué.

**Sabina**, je ne peux pas tout raconter malheureusement mais je tenais à te remercier spécialement pour ton accueil, c'est peut être un peu banal comme mot mais ça regroupe tellement de choses. Au début où j'étais pleine de doutes (oui encore plus qu'aujourd'hui) tu as su me mettre à l'aise et tu as surtout été là pour me rappeler de penser à moi. Merci pour tes innombrables « basta Liza ça suffit rentre », ces quelques mots étaient parfois essentiels à me faire relativiser. Merci pour tes énormes attentions, un petit mot, un cadeau, une petite chose que j'allais faire qui finalement a été faite, tout ce que tu as fait pour que je me sente bien. Je n'oublierai évidemment jamais mon premier voyage avec tout ce qu'il faut pour le départ grâce à toi. Enfin, merci pour nos heures de discussion et de confiance sur tous les sujets imaginables sauf la science parce qu'on en parle déjà beaucoup trop ! ;) Mais je dois quand même dire un mot à ce sujet, merci pour ton expertise avec ces machines capricieuses que sont les microscopes et surtout pour ces précieuses cellules que tu entretiens tous les jours weekend compris. Je terminerai par te remercier pour ta générosité, ton soutien permanent et ta confiance en moi qui ont été vraiment essentiels pour moi durant ces années.

**Marie-Pierre**, les années n'ont fait que nous rapprocher. Merci pour tout, du partage d'un café quand ça va pas (et de celui quand ça va au top bien sur !), à tous ces fou rire, en passant par ces longues discussions sur toutes les surprises de la vie. Tu es quelqu'un



d'incroyable à mes yeux, par ta douceur qui révèle une force de caractère et des convictions fortes et belles. Merci pour ton soutien sans faille, tes points de vue toujours apportés avec délicatesse pour ne pas blesser, tes « ça va ? » qui, dit sur un certains ton avec un certains regard veulent dire « je sais que tu me diras oui mais si jamais tu as besoin je suis juste à côté ». Je tenais également à te remercier spécifiquement pour ce projet auquel tu as apporté énormément par ton expertise et tes conseils précieux. Je retiendrai tout particulièrement nos moments western, cette merveilleuse manip remplie de surprises que l'on a souvent prises avec beaucoup de second degré ! Enfin, je tenais également à te remercier tout particulièrement pour la dernière ligne droite de cette thèse, où tu as été plus que présente et essentielle au déroulement de ce marathon. Je finirai par te dire merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné autant durant toutes ces années, je t'en suis très reconnaissante.

Je finirai par vous dire un mot à toutes les deux, mes « marraines » du labo. Vous m'avez toujours encouragé, soutenu, écouté, et j'ai pleinement conscience que sans vous, tout ceci aurait été considérablement différent.

**Fanny**, tu es arrivée plus tard mais le courant est de suite passé. C'est assez fou mais seulement quelques semaines si ce n'est quelques jours ont suffi à me rendre compte que tu étais quelqu'un de confiance et remplie de valeurs. Ton sourire quotidien fait énormément de bien, ta détermination est incroyable et en sciences tu rayannes. Ton avis sur beaucoup de choses s'est vite avéré indispensable. Merci pour tout ça, et je voudrais également spécialement te remercier pour ton aide sur la dernière ligne droite, en plus de ton soutien et tes encouragements qui m'ont énormément apporté.

**Eric**, ton regard critique a été essentiel dans ce projet. J'ai adoré tous nos échanges et au-delà de tes connaissances qui m'ont souvent impressionné je retiendrai tes expressions géniales telles que ton légendaire « sainte mère ! ». Merci pour tes opinions toujours justifiées, tes avis fermes mais honnêtes et ton soutien. Ps : les masto sont des warriors, ils sont aussi résistants aux CTL, je l'ai testé.

**Edouard**, je tenais à te dire un grand merci pour tous nos échanges. Tu es quelqu'un de brillant, enfin plutôt une tête de mule brillante ! C'est vraiment toujours un plaisir de discuter avec toi, à tel point que ton avis sur certains résultats est devenu indispensable. J'ai beaucoup appris de nos longues discussions tardives autour d'un café ou durant ces pauses censées durer « le temps de la centri ». N'oublions pas nos 2 projets nature, j'y crois !! Je pense que tu as toutes les capacités pour réussir, ta curiosité, ta passion et ton investissement ne sont que remarquables et je suis sûre qu'une longue carrière t'attend avec j'espère des gens qui arriveront à te suivre parce que ce n'est pas toujours évident ! Je parle de la science mais évidemment merci pour tous nos fous rires parfois déclenché par pas grand-chose. Merci pour tous nos moments de « ralage critiquage » extrêmes, après tout, « on a le droit entre nous non ? ! » Tu as été une oreille attentive énorme pour moi et j'espère te l'avoir rendu. Ps : pour la énième fois, oui on va aller boire une bière ça fait effectivement un petit moment qu'on n'y a pas été, à condition que tu manges autre chose qu'un café.

**Cyprien**, ta gentillesse et ton sourire quotidien t'honorent. Tu es pour moi quelqu'un rempli de bienveillance, serviable et généreux. Il peut t'arriver je ne sais quel problème ce sera difficilement visible (à part si on te connaît un peu et qu'on s'acharne) parce que tu es comme ça, toujours souriant et surtout remplis de blagues tellement merveilleuses... ;) C'était réellement un plaisir de partager ces journées avec toi. Alors merci pour tout ça spiderman. Ps : sans rancune pour les TD.

**Juliet**, my english teacher. Tu es devenue bien plus que ma prof d'anglais, ta sérénité et ta douceur font beaucoup de bien au quotidien. Tes efforts en français pour m'encourager m'ont énormément touché. Tu es quelqu'un avec un grand cœur et d'une grande patience. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites pour la suite.

**Cécile**, le monitorat en immuno a été particulièrement important pour moi durant ces 3 années. J'ai adoré cette période qui m'a énormément enrichie. C'était toujours un plaisir de discuter avec toi, de te croiser à la fac pour avoir les dernières folies administratives de l'université ou pour échanger sur comment appréhender un TD. Je voudrais également spécialement te remercier pour ton soutien, autant au labo que pour les TD tu as été toujours encourageante et adorable avec moi, merci.

**Kévin**, tu es là que depuis peu mais j'ai adoré travailler avec toi (et on n'a pas encore fini !). Merci pour ta patience d'informaticien à biologiste pour m'expliquer que « le jaune là ce n'est pas du vrai jaune ». J'adore nos conversations souvent drôles lorsqu'on essaye l'un et l'autre d'expliquer sa problématique avec des termes compréhensibles. Et je pense justement que peu de temps suffira pour que tu n'aies plus besoin d'explications venant d'un biologiste ! Tu as la passion et je pense toutes les compétences pour cette thèse qui t'attends et je te souhaite beaucoup de réussite.

Je souhaiterais maintenant dire quelques mots pour les personnes du département de pathologie de l'IUCT avec qui j'ai eu la chance d'interagir.

**Laurence**, je tenais spécialement à vous remercier de nous avoir permis l'accès à la cohorte de patients qui a déclenché j'espère le début d'une étude que je trouve vraiment passionnante. Merci pour votre disponibilité et votre expertise précieuse. Je tenais également à vous remercier de m'avoir toujours accueilli avec le sourire, même dans vos journées chargées et je suis ravie et honorée d'avoir pu interagir avec vous.

**Nathalie**, un grand merci pour les marquages de tissus de patients. Je n'ai pas vu tout l'envers du décor mais je sais que ça été beaucoup de travail et de mise au point que tu as mené à terme pour ce projet. Merci d'y avoir accordé tout ce temps et merci pour ton enthousiasme à chacune de nos conversations qui n'ont fait que m'encourager à suivre cette idée.

**François-Xavier et Arnaud**, je vous remercie pour votre patience et votre participation à nos réunions pour lesquelles votre point de vue a souvent été constructif. Et je tenais à vous remercier spécialement pour ces échanges sur l'analyse des marquages tissus avec Kevin durant cette fin de thèse, qui j'espère aboutiront à de grands résultats !

**Charlotte**, je ne sais pas si je vais trouver les mots justes pour te remercier mais ton passage dans l'équipe a démarré le début d'une amitié pour laquelle j'estime que j'ai énormément de chance. Tu es épatante, par ton intelligence, tout le travail que tu fais et ta détermination en général. Mais là je ne parle que du boulot... Si je parle du reste j'aimerais te remercier pour ta confiance, ton soutien, ta capacité à m'aider à relativiser, qui m'ont été vraiment précieux. Tu as su être là par de petites attentions quand j'en avais besoin et je sais que tu es une personne sur qui je peux compter les yeux fermés comme on en rencontre peu. J'aimerais également spécialement te remercier pour ta bonne humeur constante remarquable et contagieuse. Tu es quelqu'un de merveilleux que j'ai appris à découvrir d'abord au labo puis en tant qu'amie. Merci pour tout.

J'en arrive à tous ceux qui ont fait partie de l'équipe SV, et qui de fait, ont tous fait partie de cette thèse.

**Roxana**, tu es celle qui a démarré ce projet, m'a encadré en arrivant dans l'équipe et m'a toujours énormément soutenu. J'ai été honoré de prendre la relève. Toujours disponible pour la moindre interrogation, tu as été très importante pour moi en master et au démarrage de ma thèse. Tu as toujours trouvé du temps pour moi malgré tout le travail que tu as mené sur ce projet pas toujours facile à appréhender et tout ceci toujours avec extrême bienveillance en vers moi. Tu es pour moi une scientifique exceptionnelle et je sais que tu es ravie des résultats obtenus dans cette suite, c'est tout ce que j'espérais. Merci pour tout.

**Pauline**, génie de la science et modèle de vie sur beaucoup d'aspects, ta présence m'a apporté bien plus que tu ne l'imagines. Tu étais ma référence sur à peu près toutes les questions qui pouvaient me traverser l'esprit. Je sais que tu diras que tu n'es pas parfaite et que j'exagère mais tu as cette perfection pour moi simplement par le fait que tout ce que tu avances est réfléchi, on est d'accord ou on ne l'est pas, tu es ouverte à l'échange, à l'écoute, tu n'auras pas de point de vu affirmatif si derrière il n'y pas les arguments, et tout ça, c'est pour moi la preuve d'une grande intelligence. Je me suis beaucoup inspiré de cette façon de faire sur un grand nombre de choses, en sciences mais pas uniquement. Tu as toujours profondément cru en moi, et j'ai de suite ressenti cette sincérité qui a été essentielle pour m'aider à prendre confiance en moi. Tu as toujours trouvé les mots pour me relancer dans les moments nécessaires. Aujourd'hui je ne trouve pas vraiment les miens pour t'exprimer toute ma gratitude si ce n'est te dire que cette thèse a été une aventure merveilleuse aussi parce que tu en as fait partie. Ton départ n'a pas été facile pour moi et pourtant, il a été en même temps très facile de me consoler car j'ai toujours su que ce n'était qu'une page qui se tournait mais loin d'être la fin de l'histoire de notre amitié. Merci.

**Romain**, sacré phénomène ! J'ai appris à découvrir au-delà de tes supers blagues, toujours pleines de délicatesse, quelqu'un de brillant et remplis de convictions. Merci pour tous ces échanges, ton soutien, ces pauses café surtout au CPTP, et toutes ces fois où tu m'as traité de folle à faire ces horaires, ce qui suffisait parfois à me faire rentrer chez moi. Tu es quelqu'un de confiance et j'ai très rapidement compris que ton point de vu pouvait m'apporter beaucoup car tu m'as permis de prendre conscience de beaucoup de choses. Enfin, je me dois particulièrement de te remercier pour ton talent d'écrivain de chanson et de chanteur bien sur. Tu étais capable de me faire sourire alors que je venais de perdre

2 jours de manip pour un bug de spinning juste avec une de tes mélodies. Tu as été un confident durant mes premières années de thèse, simplement parce que tu es quelqu'un avec qui il est possible d'échanger, même si les avis divergent, tu es ouvert à la discussion et ça a été très enrichissant pour moi d'apprendre à discuter avec quelqu'un qui me sortait de ma zone de confort. Enfin je terminerai bien sur par un merci général pour cette merveilleuse aventure de thésard qu'on a quasiment démarré ensemble ! Je suis ravie de te savoir aujourd'hui épanoui dans ce que tu fais.

**Yoan**, pour moi on a démarré cette aventure ensemble et les atouts de chacun ont toujours été utiles à l'autre. Merci pour ces heures de discussions, parfois beaucoup trop longues bien entendu, mais qui ne sont que de bons souvenirs. Ces débuts dans ma super titine à papoter sur le parking jusqu'à ces soirées dans le bureau, à rentrer chez nous au bout de la 20<sup>ème</sup> fois après avoir dit « on y va ! ». Tu es extraordinaire, à tel point que tu es devenu un adjectif qui t'auto qualifie « Yoan, arrête de faire ton Yoan », moi je trouve ça fort. Plus sérieusement, tu es d'une gentillesse incroyable, ta peur de mal faire t'aura peut être un peu trop fait souffrir mais en même temps ta nécessité d'avoir le point de vu des autres va avec ta façon merveilleuse de considérer cet avis des autres dans tout ce que tu fais. Je tiens spécialement à te remercier pour la dernière ligne droite de ma thèse où tu m'as dit vouloir me rendre ce que je t'avais apporté durant la tienne mais je ne suis pas sûre d'avoir été un soutien aussi présent. Merci pour tes inlassables encouragements, ta patience à m'expliquer comment fonctionne un ordinateur dans sa globalité, ton aide « pratique » également, à savoir trouver des publications introuvables ou résoudre un problème informatique sur lequel je n'ai pas le temps de m'attarder. Tu as été une personne essentielle à cette thèse, du début à la fin, j'espère que tu t'en rends bien compte et je t'en remercie. Ps : tu verras j'ai fait une Yoan en nombre de page de remerciements.

**Delphine**, ma pouipouille, tant de fou rires, de discussion, de proximité dans cet aquarium ! Cette période aura profondément marqué ma thèse et lancé le début d'une longue amitié. C'était géniale de t'avoir, de pouvoir parler de tout (oui parfois beaucoup trop), ces moments étaient précieux car sans jugement, un grand merci pour ça. Tu es d'une profonde gentillesse et douceur, toujours prête à aider et d'une bonne humeur quotidienne précieuse (après le thé du matin bien sur). Je suis ravie de savoir que tu t'épanouies aujourd'hui avec ces cellules tueuses qui t'ont toujours passionné et je suis sûre que ta rigueur scientifique et ta curiosité te mèneront loin.

**Raïssa**, ou plutôt Madame Raïssa ;) tu évoques pour moi un grand respect de part ta force de caractère et tes convictions. Je me retrouve dans les valeurs que tu prônes et c'est en ça que je sais que j'ai trouvé une amie. J'étais ravie de ton retour à Toulouse, la microscopie a besoin de toi ! Au-delà de tes qualités humaines tu es talentueuse dans ton domaine dans lequel je pense que si on n'en fait pas partie, on ne se rend pas bien compte de tout ce que tu fais et de toutes les techniques que tu maîtrises pour finalement produire et analyser UNE image. J'aimerais particulièrement souligner ta détermination dans la vie et ta joie de vivre communicative. Merci pour nos discussions et rigolade de couloir du bâtiment F, une période précieuse de ma thèse et surtout merci pour ton soutien, même après ton départ et aujourd'hui notre déménagement, je sais que je peux toujours compter sur toi.

**Laurène**, cette thèse en co-tutelle ne nous aura laissé que quelques mois de vie de thésarde ensemble, et pourtant ils ont largement suffi à découvrir une amie. Merci pour tes petits mots, tes attentions, ton soutien, tes encouragements, même à distance tu as toujours cette petite pensée pour moi. Tu es brillante et extrêmement travailleuse je n'ai aucun doute sur ton avenir en sciences et je te souhaite vraiment toute la réussite que tu mérites.

**Yolla**, la aussi le déménagement et ta thèse en co-tutelle nous auront laissé encore moins de temps ensemble mais je voulais te remercier pour ton soutien même à distance. J'espère que tu finiras cette thèse en beauté et que tu t'épanouiras dans la suite de tes projets.

**Alice**, tu es la personne qu'on adore avoir autour de soi, toujours souriante, d'une incroyable bienveillance et toujours disponible pour un petit thé/café de décompression (pendant les temps d'incub bien sur !). J'ai été vraiment ravie de partager cette période de ma thèse avec toi. Merci pour tous ces bons moments, ta générosité et ton soutien, même après ton départ, qui m'ont beaucoup touché.

**Javier**, tu es pour moi un grand scientifique et discuter avec toi de ce projet ne sont que de bons souvenirs. Ton humour et ton accent du soleil ont rapidement manqué à l'équipe. Merci pour ta bonne humeur constante qui a marqué pour moi cette période de ma thèse que l'on a partagé.

J'en arrive à remercier les supers stagiaires avec lesquels j'ai eu la chance de travailler.

**Rémi**, heureusement que tu étais venu pour un stage volontaire sans pression de rapport à rendre ! Merci pour ces 5 semaines pleines de fou rire et d'échanges scientifiques passionnants. Je suis convaincue que tu as toutes les capacités pour réussir, ta curiosité et ta détermination te mèneront loin. Merci d'être passé dans l'équipe, tu es pour moi la première personne que j'ai du « encadrer » et j'ai beaucoup appris de cette première expérience. Je suis ravie de savoir qu'aujourd'hui t'es un super thésard !

**Susanne**, on a formé un duo de choc j'en suis sûre ! « petite Chef et grande Chef » étaient en place pour révéler tous les secrets des cellules tueuses ! C'était 8 mois géniaux, j'ai tellement appris à tes côtés. Malgré toutes les difficultés tu gardes toujours le sourire, tu profites de chaque instant et tu sais considérer ce qui nécessite de l'importance ou pas. J'ai réellement trouvé une amie, qui a décidé de partir pour de nouveaux horizons certes, mais comme tu me l'as dit un jour, chaque fois qu'on se voit c'est comme si on s'était vu la veille, et ça c'est précieux. Je me souviendrai de tes efforts en français à nos débuts de communication, je te remercie pour ce poème que je garde précieusement et pour tous nos moments de rigolade et de confiance. Et pour finir j'aimerais souligner ta présence, même à distance qui m'a beaucoup touché et sur laquelle je sais que je peux compter. Ps : je suis incapable de dire « c'est cool ça ! » sans penser à toi.

**Sahra**, ma petite sœur, tu es venue passer une petite semaine de découverte de la vie de labo. Je vais juste dire un petit mot pour cette semaine qui était pour moi un honneur de savoir que tu voulais découvrir vraiment ce que je faisais. Je sais que tu feras de grandes découvertes, dans ce domaine qui te passionne tant, les animaux sauvages n'ont déjà

presque plus de secret pour toi et je suis sûre que tu seras une zoologiste incroyable (oui zoologiste c'est pas ceux qui travaillent dans les zoos j'ai bien compris).

**Louise**, tu es arrivée dans l'équipe pour ton stage de M2 durant une période où ce projet ouvrait à pleins de questions plus ou moins démarrées auxquelles tu t'es réellement attaché à répondre avec application et investissement. Merci pour tout le travail que tu as accompli. Tu es persévérante et je suis sûre que tu t'épanouiras dans la recherche. J'ai aussi beaucoup appris à tes côtés. Tu étais parfois pleine de doutes et j'espère avoir réussi à te prouver que tu étais capable de superbes découvertes ! Enfin je finirai par te remercier pour ces moments de rigolade spécialement face à ces résultats de clariostar qui nous auront donné du fil à retordre !

**Hanaé**, ces 5 semaines à travailler sur mes résultats d'un point de vu mathématique ont été très enrichissantes pour moi. Merci pour ta collaboration à ce projet, ta bonne humeur et nos échanges math-bio toujours supers intéressants.

J'en arrive à 2 personnes qui sont passés en stage dans l'équipe, qui n'ont pas directement travaillé avec moi mais que je tiens à remercier.

**Marine**, ma prof de maths personnelle ! Merci pour ta disponibilité, tes explications toujours claires et ton soutien. Même après ton départ de l'équipe tu es toujours disponible à m'aider et je t'en remercie profondément. Je parle du travail mais évidemment merci pour tout le reste, tes encouragements et ta confiance en moi. Je sais qu'on partage pleins de valeurs communes, et pipelette que nous sommes on trouve toujours pleins de choses à se raconter. Je vous souhaite que du bonheur avec spiderman.

**Adèle**, tout d'abord je tenais à te remercier pour ce que tu as apporté à ce projet durant ton stage de M1. Merci également pour ta bonne humeur permanente et contagieuse. Je suis ravie de te revoir pour le M2, je te souhaite vraiment de t'amuser autant que moi à faire des combats de cellules et je pense vraiment que tu as toutes les capacités pour réussir dans ce domaine.

Je tiens maintenant à remercier spécialement les plateaux techniques, dans l'ordre chronologique, du CPTP et du CRCT.

La microscopie du CPTP, **Danièle, Astrid, Sophie**, merci pour votre patience avec ces machines capricieuses.

**Danièle** merci pour ton soutien, pour toutes les fois où tu venais voir si tout va bien, où toutes les fois où en passant devant ton bureau j'entendais « tiens regarde Liza j'ai fait des gateaux ! ». Et enfin merci pour toutes les fois où tu es restée tard pour être sûre que tout fonctionne ou juste pour parler un peu et m'accompagner.

**Astrid et Sophie** je dois spécialement vous remercier pour votre patience avec moi et Image J et vos connaissances qui ont été plus que précieuses. Astrid un grand merci d'avoir réussi à apprivoiser le Spinning et merci pour ta disponibilité à chaque petit pépin et ton aide indispensable dans la mise au point de cette microscopie ultra-rapide.

La cytométrie du CPTP, **Fatima, Anne-Laure, Valérie**, je n'ai qu'une chose à dire, ce projet ne m'a pas permis de faire assez de tri !! Merci pour votre bonne humeur, c'était toujours un

plaisir de vous croiser dans ce bâtiment F, à table ou au milieu du couloir, c'était une chance d'être si bien entourée.

Enfin, je remercie **Laetitia et Manon** du CRCT pour votre sourire à chaque fois qu'on vous croise, votre disponibilité et votre patience.

Je tiens à remercier également tous les membres du CPTP et du CRCT que j'ai pu croiser durant ces journées de manip parfois longues. Je dirais un mot spécialement pour le 4<sup>ème</sup> étage du CRCT. C'est toujours un plaisir de vous croiser et d'échanger quelques mots, Nadège, Andréa, Léa, Marine, Sahar, Lucie, Candice, Noémie, Laura, Laura, Camille, Virgine, Maxime, Jérémy...

Je souhaite remercier spécialement **Marie V**, dès notre arrivée au CRCT tu as tout fait pour qu'on s'intègre et j'ai de suite rencontré une amie. Merci pour ton soutien, tes encouragements sans relâche, et ta générosité incroyable.

Je tiens également à remercier le **service technique et informatique** du CRCT, toujours disponibles et efficaces au moindre souci.

Enfin, merci à **Domi**, ton sourire permanent rayonne dans les couloirs tous les matins, merci d'être la personne qu'on est ravie de croiser pour échanger quelques paroles accompagnées très souvent de quelques rires et repartir dans sa journée recharger à fond !

Viens le moment où je tiens spécialement à remercier mes amies.

**Marie**, ça y est j'ai fini les études ! Avoue que t'y croyais plus ! Depuis le lycée beaucoup de choses ont changé dans nos vies et pourtant notre amitié n'a pas bougé. Tu fais partie de celles que je peux appeler pour la moindre raison, tu es sans jugement et toujours disponible si besoin. Merci de m'avoir toujours soutenue, de m'avoir écouté parler de cette thèse avec patience et toujours encouragé à continuer même si je te cite « je ne sais pas comment tu fais pour être encore dans les études ! ». Je suis très fière de t'avoir comme amie, ta force de caractère est incroyable, tu es toujours positive malgré tout ce que tu as pu traverser ou tout ce que tu peux voir durant tes journées de travail difficiles. Tu es une amie comme on en a peu, une infirmière incroyable j'en suis sûre, et surtout maintenant une maman au top ! J'ai hâte d'avoir plus de temps pour profiter davantage de mon petit amour de nièce.

**Mélanie**, à nos belles années de licences ! Cette thèse est la finalité de ce parcours que j'ai démarré à la fac avec toi. Merci pour tous ces moments, ces fous rires, ces repas, ces sorties, mes débuts d'années fac sont marquées grâce à toi. Et aujourd'hui merci d'avoir cru en moi, de m'avoir écouté et merci spécialement pour tes réactions que j'adore « ah mais ce qu'on a appris en licence ça te sert en fait !! ». Je ne peux pas tout raconter mais merci pour tous ces souvenirs, tes apparts où j'avais presque fini par aménager, la super clio toujours en forme à 7h42 et j'en passe. Merci pour nos retrouvailles plus rares durant cette thèse mais toujours remplies de fou rire.

**Pépé**, je t'ai rencontré grâce à Manon qui à force de m'embarquer partout m'a fait atterrir chez toi. J'y ai découvert une Pépé toujours au top, toujours prête pour la rigolade et pour profiter de chaque instant sans se prendre la tête. Je tenais spécialement à te remercier pour tous ces moments durant ces 4 dernières années qui ont fait partie de cette aventure qu'est cette thèse. A nos weekends à Toulouse, à Nîmes, nos vacances en Espagne pas vraiment en Espagne, ces soirées, concert, restau, spectacle, tellement de bons moments

gravés. J'ai découvert une amie, à l'écoute, une pile de bonne humeur dont on ne peut pas se passer. Merci pour tout.

**Mathou** (je crois ne jamais t'avoir appelé Mathilde de ma vie), c'est aussi Manon qui nous a réunis et rien que pour ça je lui dois beaucoup. Merci de m'avoir accepté en tant que petit padawan de la night. Je vais bien sur parler de ces soirées aux Carmes à chanter à en perdre la voix et surtout à rire. Tu es quelqu'un d'incroyable mais malheureusement on doit trop souvent te le rappeler. Ta force est honorable et tu le sais, je te l'ai déjà dit, j'ai beaucoup d'admiration pour toi et ta façon de surmonter les choses. Je ne vais pas en faire trop mais je tiens à profiter de ce moment pour te rappeler cette personne merveilleuse que tu es et te remercier pour la joie, le soutien, l'écoute que tu as su m'apporter durant cette thèse.

**Manon**, je crois que j'ai le même souci que toi, tu es une des personnes pour laquelle j'ai le plus de mal à trouver les mots. Par où commencer ? Le début, la fac, le master, une rencontre et une vie bouleversée, oui clairement. C'était évident, on a mangé une fois ensemble et on ne s'est plus quitté. Merci pour tout ce que tu m'as apporté. Je pense que tu ne te rends pas bien compte de l'inspiration que tu as été pour moi. Tu m'as montré que certaines choses étaient simples, il fallait juste foncer. Mais foncer en rigolant, peu importe ce qu'on croise, et surtout découvrir ce qui nous entoure, sans oublier de faire des pauses pour profiter des gens qui traversent notre route. On ne se connaît pas depuis l'enfance mais c'est tout comme. Tu es impressionnante, par ta détermination, ta joie de vivre, ta générosité et ta force. Je suis fière de t'avoir comme amie Dr N. Je sais que peu importe la distance rien ne changera et cette aventure qu'est la thèse et que l'on a vécu ensemble n'est qu'une aventure parmi toutes celles qui nous attendent.

Je tiens à dire un mot aussi pour la famille Nayrac qui a rythmé mes weekends d'été, merci pour votre accueil et votre immense générosité. Ces moments font partis de cette thèse et ont été pour moi à chaque fois des petites vacances, un endroit où vous allez et vous savez que vous vous sentirez bien. Vive Cabrières et vive Mamie Lulu !

**Manon et Mathou**, je dois dire un mot obligatoire pour nos voyages durant cette thèse, et particulièrement mon premier voyage. Je ne sais pas si vous vous rendez bien compte de la signification de tout ça pour moi et de tous les souvenirs incroyables que ça m'a apporté, merci encore. Apparemment bientôt on visite le Canada... Une fois qu'on aura fini de vagabonder, le GinBiches nous attend n'oubliez pas.

Bon je crois que j'ai battu les recors du nombre de pages de remerciements mais là je suis loin d'arriver aux personnes pour lesquelles je vais arriver à faire court.

**Mes parents**, je sais que vous êtes fiers d'avoir cette thèse entre vos mains. J'aimerais juste vous rappeler que c'est grâce à vous. Je tiens à souligner tous les sacrifices que vous avez faits pour notre réussite et surtout que l'on manque de rien. J'en ai conscience et même si ce que je vais dire est très cliché, c'est en ça que vous êtes les parents les plus merveilleux de cette planète.

**Papa**, tu m'as toujours dit qu'apparemment petite je voulais faire un métier où je cherchais à comprendre les choses, je crois que c'est mission accomplie. Tu as toujours cru en moi, tu m'as toujours encouragé, tu m'as appris à viser l'exigence, à toujours faire de mon mieux, à



tout donner jusqu'à la dernière minute pour ne jamais rien regretter. Mais surtout tu m'as appris à me relever de mes échecs, à comprendre que c'est ça qui nous construit et nous enrichis. **Maman**, par où commencer ? Tu vis ce qu'on vit. Je crois que c'est un bon résumé de notre relation. Donc cette thèse tu l'as aussi vécu de l'intérieur. Comment te remercier pour toutes ces attentions qui rythment mon quotidien, pour ton soutien et ta confiance en nous qui nous pousse sans cesse vers le haut.

Papa, maman, vous le savez, vous êtes mes piliers.

Pour continuer à pleurer face à mon ordinateur, j'en arrive à mes sœurs. La grande, **Nora**, et la petite, **Sahra**. Le trio inséparable. Nora tu es mon éternelle confidente depuis toujours, ta force de caractère et ta détermination ont toujours été exemplaire pour moi. Sahra je sais que tu adores quand je dis ça mais tu resteras toujours mon petit baby et je suis si fière de la jeune fille pleine de convictions que tu es devenue. Je ne vais pas être très longue car je sais très clairement pourquoi je dois vous remercier : vous êtes toujours là. Il n'y a rien à dire de plus, il peut se passer n'importe quoi, celles qui sont là, c'est vous. Avec vous je suis comme invincible, je suis complètement dans les clichés mais c'est tellement vrai. Vous êtes ce qui fait de moi aujourd'hui une personne chanceuse. Nos différences nous rapprochent et ces liens qui nous unissent sont difficilement descriptibles. Alors simplement merci d'être à mes côtés.

**Simon**, voilà bientôt 8 ans que tu fais partie de ma vie et que tu me soutiens pour que cette soutenance arrive. Tu es celui qui aura vécu ces dernières années au plus près et je ne sais pas comment t'exprimer toute ma gratitude. Je ne réalise pas encore vraiment je crois la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés, même après toutes ces années. Je n'arriverai pas à te remercier pour tout ce que tu m'apporte mais je tiens à te remercier d'avoir toujours cru en moi, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci de toujours, et j'insiste sur toujours, œuvré pour mon bonheur. Tu es mon confident, mon épaule de soutien quotidienne. Cette thèse aurait été très compliquée sans toi. Et je tenais à profiter de ce moment pour te rappeler la personne incroyable que tu es. Enfin, merci pour ta patience à m'écouter parler de combats de cellules durant des heures, à subir mes humeurs et merci d'avoir toujours su m'apaiser. Cette thèse c'est aussi un peu la tienne.

Je tiens à remercier tout particulièrement ta maman **Isabelle**, qui m'encourage depuis le début. Merci d'avoir réussi parfois à calmer mes doutes et à me rappeler sans cesse que je vais y arriver. Merci pour tous ces moments, ces repas en famille, ce voyage, merci de m'avoir toujours énormément gâté. J'en profite également pour remercier **Mamie Odette**, **Papi Joachim et Tatïe Jeannette**, qui m'ont également toujours soutenu et qui ont fait preuve d'une grande compréhension concernant mon absence aux repas de famille, absence que j'ai trouvé parfois bien trop longue. Je tenais également particulièrement à vous remercier pour votre présence sur la dernière ligne droite de cette thèse qui nous a permis je cite de « bien manger même si on travaille trop ! ».

Je tiens également à remercier **Denis, Brigitte, Lucile et Jeff** pour votre accueil dans la famille, pour ces bons repas de pause du weekend tous ensemble et tout vos encouragements dans mon parcours.

Voilà j'ai beaucoup trop parler mais je savais que je n'arriverai pas à faire autrement.

MERCI A TOUS POUR CETTE AVENTURE HUMAINE INCROYABLE !

# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Résumé

Abstract

|                                                                                    |            |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I) INTRODUCTION</b>                                                             | <b>11</b>  |
| <b>I.1. L'interaction LT-CPA</b>                                                   | <b>11</b>  |
| I.1.a) Organisation génétique et fonctions des molécules de CMH et du TCR          | 15         |
| I.1.b) L'interaction TCR-CMHp                                                      | 23         |
| I.1.c) La transduction du signal par le TCR                                        | 32         |
| I.1.d) La synapse immunologique LT-CPA                                             | 38         |
| I.1.e) Fonctions de la synapse immunologique                                       | 47         |
| <b>I.2. La synapse lytique CTL-cellule cible</b>                                   | <b>52</b>  |
| I.2.a) Les granules lytiques : de leur biogénèse à leur exocytose                  | 53         |
| I.2.b) Fonctions effectrices des CTL                                               | 63         |
| I.2.c) La synapse lytique sur le site infectieux/tumoral                           | 75         |
| <b>I.3. L'immunosurveillance anti tumorale</b>                                     | <b>78</b>  |
| I.3.a) Le concept de « cancer immunoediting »                                      | 78         |
| I.3.b) Les mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire                 | 84         |
| <b>I.4. Le mélanome, un cancer immunogène</b>                                      | <b>90</b>  |
| I.4. a) Développement                                                              | 90         |
| I.4.b) Un cancer immunogène                                                        | 93         |
| <b>I.5. Les thérapies contre le mélanome, les immunothérapies et leurs limites</b> | <b>96</b>  |
| I.5.a) Les thérapies ciblées                                                       | 97         |
| I.5.b) Les immunothérapies                                                         | 98         |
| I.5.c) La SI, nouvelle cible thérapeutique ?                                       | 104        |
| <b>I.6. Les lysosomes et mécanismes de réparation membranaire</b>                  | <b>106</b> |
| I.6. a) La biologie des lysosomes et des mélanosomes                               | 106        |
| I.6. b) Rôle des lysosomes dans la réparation des dommages membranaires            | 110        |
| I.6. c) Protection des CTL de leur propre perforine                                | 112        |

|             |                                                                                                                                        |            |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>II)</b>  | <b>OBJECTIFS DE THESE</b>                                                                                                              | <b>113</b> |
| <b>III)</b> | <b>RESULTATS</b>                                                                                                                       | <b>115</b> |
|             | <b>Partie 1 : Article en cours de finalisation “ Rapid calcium entry at the lytic synapse protects melanoma cells from CTL attack”</b> |            |
|             | Introduction                                                                                                                           |            |
|             | Results                                                                                                                                |            |
|             | Material and Methods                                                                                                                   |            |
|             | Discussion                                                                                                                             |            |
|             | Figures                                                                                                                                |            |
|             | Supplementary figures                                                                                                                  |            |
|             | <b>Partie 2 : Données préliminaires et additionnelles au projet de recherche</b>                                                       | <b>166</b> |
|             | A) Le compartiment endo-lysosomal des cellules de mélanome                                                                             | 168        |
|             | 1. Les cellules de mélanome sont enrichies en compartiment endolysosomal par rapport à des cellules sensibles                          | 168        |
|             | 2. Altérer l’activité protéases des cellules de mélanome augmente leur sensibilité à la lyse des CTL                                   | 171        |
|             | 3. La cinétique de réponse des cellules de mélanome est très rapide                                                                    | 175        |
|             | 4. La résistance des cellules de mélanome est intrinsèque au lignage mélanocytaire                                                     | 178        |
|             | 5. Etude du compartiment lysosomal dans des échantillons de patients atteints de mélanome métastatique                                 | 179        |
|             | B) La résistance des cellules de mélanome est-elle partagée par d’autres types de tumeur ?                                             | 182        |
|             | 1. Les cellules de carcinome mammaire résistent à l’attaque des CTL                                                                    | 182        |
|             | 2. L’inhibition des protéases aspartiques                                                                                              | 184        |
|             | C) Application de la méthode brevetée à l’analyse de l’activation des CTL et de leur potentiel lytique face à des cellules sensibles   | 185        |
| <b>IV)</b>  | <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>                                                                                                      | <b>189</b> |
| <b>V)</b>   | <b>CONCLUSION</b>                                                                                                                      | <b>199</b> |
| <b>VI)</b>  | <b>BIBLIOGRAPHIE</b>                                                                                                                   | <b>200</b> |

## Liste des abréviations

|               |                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------|
| Ac            | Anticorps                                            |
| ADAP          | Adhesion and Degranulation-promoting Adapter Protein |
| ADN           | Acide Desoxyribonucléique                            |
| BSA           | Bovine Serum Albumin                                 |
| CHS           | Chediak-Higashi Syndrome                             |
| CLIP          | Class II associated Li Peptide                       |
| CLP           | Common Lymphoid Progenitor                           |
| CMH           | Complexe Majeur d'Histocompatibilité                 |
| CMHp          | Complexe CMHI-peptide                                |
| CMP           | Common Myeloid Progenitor                            |
| COX2          | Cyclooxygénase 2                                     |
| CPA           | Cellule Présentatrice d'Antigène                     |
| CTL           | Cytotoxic T Lymphocytes                              |
| DAG           | Diacylglycérol                                       |
| DAMP          | Dammage associated molecular pattern                 |
| DC ou CD      | Cellules dendritiques                                |
| ESCRT         | Endosomal Sorting Complexes Required for Transport   |
| GADS          | Grb2-related Adapter Downstream of Shc               |
| GRB2          | Growth Factor Receptor Bound Protein 2               |
| HIF-1         | Hypoxia Inducible Factor 1                           |
| HLA           | HumanLeukocyte Antigen                               |
| HPS2          | Syndrome Hermansky-Pudlak de type 2                  |
| IFN- $\gamma$ | Interféron $\gamma$                                  |
| ICAM1         | Intercellular Adhesion Molecule 1                    |
| IDO           | Indoleamine 2,3-DiOxygenase                          |
| IL-2          | Interleukine 2                                       |
| IL-6          | Interleukine 6                                       |
| IL-10         | Interleukine 10                                      |
| IP3           | Inositol triphosphate                                |
| ITAM          | Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif       |

|                  |                                                                       |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| ITK              | IL2-inducible T-cell Kinase                                           |
| LAMP             | Lysosome Associated Membrane Protein                                  |
| LAT              | Linker for the Activation of T cells                                  |
| LB               | Lymphocyte B                                                          |
| Lck              | Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase                           |
| LT               | Lymphocyte T                                                          |
| MAPK             | Mitogen Activated Protein Kinase                                      |
| MIIC             | Compartment CMHII                                                     |
| M-CSF            | Monocyte Colony-Stimulating Factor                                    |
| MDSC             | Myeloid-Derived Suppressor Cells                                      |
| mTEC             | medullary Thymic Epithelial Cells                                     |
| NK               | Natural Killer                                                        |
| NOS2             | Nitric oxide synthase 2                                               |
| PAMP             | Pathogen Associated Molecular Pattern                                 |
| PFA              | Paraformaldéhyde                                                      |
| PGE <sub>2</sub> | Prostaglandin E2                                                      |
| PIP2             | phosphatidyl-inositol-4-5-biphosphate                                 |
| PKC $\zeta$      | Protein kinase C, zeta                                                |
| PLC $\gamma$ 1   | Phospholipase Cgamma 1                                                |
| PRR              | Pattern recognizing receptors                                         |
| RAG              | Recombination Activating Gene                                         |
| RE               | Reticulum Endoplasmic                                                 |
| RSS              | Recombination signal sequences                                        |
| SI               | Synpase Immunologique                                                 |
| SLP76            | SH2 domain-containing Leukocyte Protein of 76 kDa                     |
| cSMAC            | central Supramolecular Adhesion Complex                               |
| SNARE            | Soluble N-ethylmaleimid-sensitive-factor Attachment protein REceptor) |
| SytVII           | Synaptotagmine VII                                                    |
| TAM              | Tumor Associated Macrophages                                          |
| TAN              | Tumor Associated Neutrophils                                          |
| TAP              | Transporter ssociated with Antigen Processing                         |
| TCR              | T Cell Receptor                                                       |

|      |                                          |
|------|------------------------------------------|
| TGFβ | Transforming Growth Factor               |
| Th   | T helper cells                           |
| TIL  | Tumor Infiltrating Lymphocytes           |
| TNF  | Tumor Necrosis Factor                    |
| Treg | lymphocytes T régulateurs                |
| VAV1 | vav guanine nucleotide exchange factor 1 |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor       |

## Liste des figures

### INTRODUCTION

Figure I.1 : Images de microscopie électronique à balayage des synapses formées par les cellules immunitaires.

Figure I.2 : Développement des cellules hématopoïétiques.

Figure I.3 : Structure du CMH de classe I.

Figure I.4 : Voie de présentation par le CMH de classe I.

Figure I.5 : Structure du CMH de classe II.

Figure I.6 : Voie de présentation par le CMH de classe II.

Figure I.7 : Développement des LT dans le thymus.

Figure I.8 : Réarrangement des gènes codant pour la chaîne  $\alpha$  et la chaîne  $\beta$  du TCR.

Figure I.9 : Structure du TCR.

Figure I.10 : Le complexe TCR et ses co-récepteurs.

Figure I.11 : Modèle d'activation du TCR.

Figure I.12 : « Kinetic proofreading model »

Figure I.13 : Modèle d'engagement en série du TCR.

Figure I.14 : La transduction du signal par le TCR.

Figure I.15 : Diversité des molécules de co-signalisation stimulatrice ou inhibitrice.

Figure I.16 : Voies de signalisation co-stimulatrice ou co-inhibitrice des récepteurs de la famille CD28.

Figure I.17 : Schéma des 3 phases de l'interaction LT-CPA.

Figure I. 18 : Diversité des zones d'interaction moléculaire à la SI.

Figure I. 19 : La SI mature.

Figure I.20 : Les différents modes d'interaction LT-CPA et la conséquence de ces interactions.

Figure I.21 : Les 3 signaux d'activation d'un LT par une DC.

Figure I.22 : La signalisation du TCR peut avoir lieu au niveau du pSMAC et du cSMAC.

Figure I.23 : L'interaction d'un CTL avec une cellule cible.

Figure I.24 : Biogénèse des granules lytiques.

Figure I.25 : Activation et cinétique de réponse des LT.

Figure I.26 : Exocytose des granules lytiques.

Figure I.27 : Structure de la perforine.

Figure I.28 : Formation de pores par la perforine à la SI.

**Figure I.29 : Voie d'induction de l'apoptose par les granzymes.**

**Figure I.30 : Induction de l'apoptose des cellules cibles par la voie perforine-granzymes.**

**Figure I.31 : Voie de signalisation induite par la voie FAS et sa régulation par BCL-2.**

**Figure I.32 : Le concept du « cancer immunoediting ».**

**Figure I.33 : L'état de dormance, un composant de la progression tumorale.**

**Figure I.34 : Les mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire.**

**Figure I.35 : Niveau d'expression des récepteurs inhibiteurs (iR) durant la phase effectrice.**

**Figure I.36 : Facteurs de risque de développement d'un mélanome.**

**Figure I.37 : Progression de la transformation tumorale des mélanocytes.**

**Figure I.38 : Modèles proposés pour la progression des mélanomes se développant sur des sites exposés au soleil.**

**Figure I.39 : Thérapies approuvées par la FDA pour le traitement du mélanome.**

**Figure I.40 : Les thérapies qui potentialisent le cycle d'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale.**

**Figure I.41 : Biologie des lysosomes.**

**Figure I.42 : Biogénèse et transport des mélanosomes.**

**Figure I.43 : Les trois modèles de réparation membranaire.**

## **RESULTATS**

**Figure III.1 : Les cellules de mélanome sont enrichies en compartiment endolysosomal par rapport à des cellules sensibles à l'attaque des CTL**

**Figure III.2 : Les cellules de mélanome sont enrichies en compartiment vésiculaire acide par rapport à des cellules sensibles à l'attaque des CTL.**

**Figure III.3 : Le prétraitement des cellules de mélanome par un cocktail d'inhibiteurs de protéases augmente leur sensibilité à l'attaque des CTL.**

**Table 1 : Liste des inhibiteurs de protéases contenus dans le cocktail et leur spécificité.**

**Figure III.4 : L'inhibition de la cathepsine B durant l'attaque des cellules de mélanome par les CTL n'a pas d'effet sur la cytotoxicité.**

**Figure III.5 : L'augmentation du recyclage membranaire des cellules de mélanome est plus rapide par rapport à des cellules sensibles à l'attaque des CTL.**

**Figure III.6 : Les mélanocytes humains résistent à l'attaque des CTL.**

**Figure III.7 : Marquage du contenu en lysosomes et de l'infiltrat de LT CD8<sup>+</sup> de lésions de mélanomes métastatiques humains.**



**Figure III.8 : Les cellules de carcinome mammaire résistent à l'attaque des CTL.**

**Figure III.9 : Un inhibiteur de protéase aspartique augmente la sensibilité des cellules cibles à l'attaque des CTL.**

**Figure III.10 : Comparaison de l'exposition de CD107a à l'intégration de FM1-43 dans les CTL.**

**Figure III.11 : L'activation des CTL détectée par l'internalisation de FM1-43 corrèle avec leur activité lytique.**

## Résumé

# **Les mécanismes moléculaires de résistance des cellules de mélanome à l'attaque des lymphocytes T cytotoxiques à la synapse immunologique**

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire contre les cellules tumorales. Ils induisent l'apoptose de leurs cellules cibles par la sécrétion de granules lytiques dans une zone spécialisée appelée synapse immunologique (SI). Cette capacité lytique place les CTL au cœur de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer la réponse immunitaire des patients contre les cellules tumorales. Ces stratégies sont prometteuses mais nécessitent encore des améliorations pour être bénéfiques à un plus grand nombre de patients et pour limiter les effets secondaires. Nous avons émis l'hypothèse que l'efficacité limitée des CTL contre les tumeurs est le résultat d'un déséquilibre entre leur capacité à tuer et des mécanismes de résistance à cette attaque, intrinsèque aux cellules tumorales.

Pour étudier cette hypothèse, l'équipe s'est concentrée sur les mécanismes moléculaires déclenchés à la SI formée par les CTL et les cellules de mélanome. Cet axe de recherche a conduit à la mise en évidence de la résistance des cellules de mélanome à l'attaque des CTL par un nouveau mécanisme de défense qui passe par la sécrétion de leurs lysosomes, entraînant une dégradation de la perforine à la synapse lytique (SL).

Mon projet visait à comprendre la cinétique de réponse et les mécanismes moléculaires impliqués dans cette défense synaptique. Tout d'abord, par une approche de cytométrie en flux, nous avons pu démontrer que la formation de pores par la perforine déclenche des mécanismes de réparation membranaire dans les cellules de mélanome. Puis par une approche de microscopie en temps réel, nous avons observé que ces mécanismes sont localisés dans la zone de contact avec les CTL. Nous nous sommes ensuite intéressés au signal permettant aux cellules de mélanome de détecter l'attaque du CTL, nous avons pu mettre en évidence, par vidéomicroscopie ultra-rapide, la formation de gradients de  $\text{Ca}^{2+}$  qui démarrent à la SL, au cours des premières minutes de contact avec le CTL par les pores formés par la perforine à la membrane plasmique. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la cinétique et de la localisation de l'exposition des lysosomes par les cellules de mélanome durant ces premières minutes. Pour cela, nous avons exprimé dans des cellules

de mélanome le marqueur de lysosome CD107a couplé à une protéine fluorescente sensible au pH. Ces expériences permettant de visualiser en temps réel l'exposition lysosomale à la membrane plasmique ont montré que dès les premières minutes de contact, les cellules de mélanome sont capables d'exposer rapidement leurs lysosomes à la SL, avant même la polarisation complète de la machinerie lytique du CTL. Enfin, nous avons pu mettre en évidence que l'altération de la signalisation calcique par traitement pharmacologique ou par la diminution de l'expression de la synaptotagmine VII (une protéine SNARE  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante) augmente la sensibilité des cellules de mélanome à l'attaque des CTL.

L'ensemble de ces résultats démontrent que les cellules de mélanome utilisent des mécanismes de réparation membranaire pour se défendre rapidement de l'attaque des CTL. Ils mettent également en évidence un rôle protecteur inattendu de la signalisation calcique dans les cellules tumorales. Enfin, cette étude révèle une nouvelle implication de la sécrétion lysosomale dans la résistance des tumeurs à la surveillance immunitaire. Interférer avec la résistance synaptique des cellules de mélanome pourrait ainsi être une stratégie complémentaire aux stratégies thérapeutiques actuelles visant à potentialiser l'activité du CTL afin d'améliorer leur efficacité.

## Abstract

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) play an essential role in the immune response against tumor cells. They induce apoptosis of target cells by secretion of their lytic granules in a specialized area named the immunological synapse. This lytic ability places CTLs at the heart of new therapeutic strategies to improve patients' immune responses against tumor cells. These strategies are promising but still need to be improved to be beneficial to a higher number of patients and to limit side effects. We hypothesize that the limited efficacy of CTLs against tumors is the result of an imbalance between their ability to kill and intrinsic resistances mechanisms of tumor cells.

To investigate this hypothesis, the team focused on molecular mechanisms triggered at the immunological synapse formed by CTLs and melanoma cells. This line of research has led to the discovery of melanoma cells resistance to the attack of CTLs at the lytic synapse through a new defense mechanism, via the secretion of their lysosomes, leading to perforin degradation at the lytic synapse.

My project aimed to better understand the time kinetics and the molecular mechanisms involved in this synaptic defense. First, through an optimized flow cytometry approach, we were able to show that pore formation by perforin triggers membrane repair mechanisms in melanoma cells. Using live cell time-lapse microscopy, we observed that these mechanisms are taking place in the contact area with CTLs. In order to determine the signal allowing melanoma cells to sense CTL attack, we studied using ultra-rapid time-lapse microscopy  $\text{Ca}^{2+}$  entry in melanoma cells via the plasma membrane pores induced by perforin. These experiments allowed us to show the formation of  $\text{Ca}^{2+}$  gradients starting at the lytic synapse, during the first minutes of contact with CTL. We were therefore interested to study the time kinetics and localization of lysosome exposure by melanoma cells during these first minutes. To do this, we expressed in melanoma cells CD107a coupled to a pH-sensitive fluorescent protein. These experiments allowing to visualize in real time lysosomal exposure on the plasma membrane, showed that since the first minutes of contact, melanoma cells are able to rapidly expose their lysosomes at the lytic synapse, even before the complete polarization of CTL's lytic machinery. Finally, we observed that melanoma cells pretreatment with a  $\text{Ca}^{2+}$  chelator and silencing synaptotagmin VII expression (a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent protein involved in lysosome secretion) increase melanoma cells sensitivity to CTL attack.

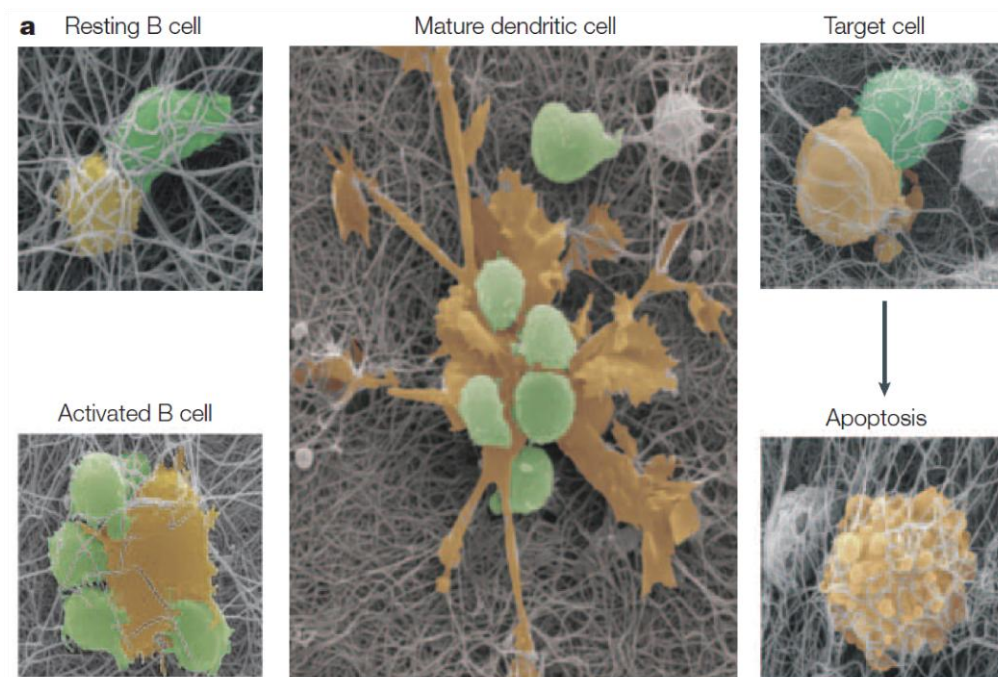
These results demonstrate that melanoma cells use membrane repair mechanisms to rapidly defend themselves from CTL attack. They also highlight an unexpected protective role of calcium signaling in tumor cells. Finally, in its whole, our study highlights a new implication of lysosome secretion in the resistance of tumors to immune surveillance. Interfering with the synaptic resistance of melanoma cells could synergize with current therapeutic strategies aiming at potentiating CTL activity and thus provide benefit to melanoma patients.

## **I. INTRODUCTION**

Dans ce manuscrit nous nous concentrerons sur les diverses fonctions de la synapse immunologique (SI) régies par l'interaction des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et du TCR (T cell receptor). Après un bref retour sur la fonction historiquement la plus décrite de la SI, nous détaillerons la production et la structure des molécules de CMH et du TCR essentiels à la formation de la SI. Les modèles d'interaction de ces 2 molécules seront ensuite approfondis. Ceci nous permettra ainsi d'apporter la conséquence de cette interaction moléculaire sur la formation de la SI et ses différents sous types, dans le but de conclure sur la fonction de cette structure si particulière. Dans une seconde partie, un certain type de SI sera particulièrement expliqué étant l'objet d'étude de ces travaux de thèse : la synapse lytique. Enfin, ces travaux se plaçant dans un contexte particulier, le contexte tumoral, celui-ci sera alors détaillé pour y replacer l'intérêt majeur d'y étudier la synapse lytique.

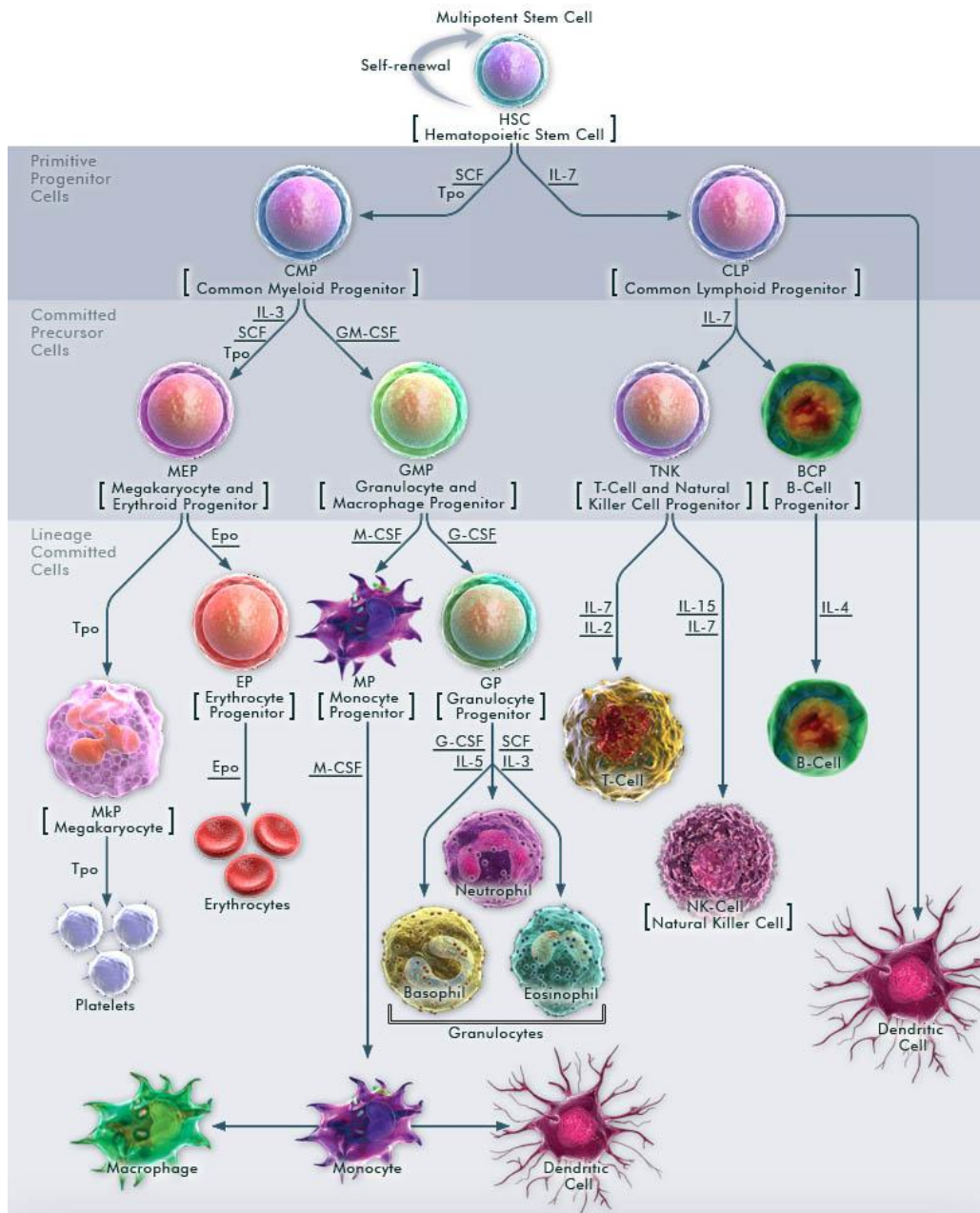
### **I.1. L'interaction LT-CPA**

L'interaction des membranes plasmiques de deux cellules forme une structure spécialisée appelée synapse permettant la transmission d'un signal. Initialement, ce terme a été utilisé pour décrire l'interaction de deux neurones entre eux ou avec d'autres types cellulaires tels que les cellules musculaires. Il a été par la suite découvert que les cellules immunitaires sont également capables de former des synapses (Norcross, 1984). Plus transitoire que les synapses neuronales, elles sont tout aussi structurées et essentielles à l'activation cellulaire (Dustin and Colman, 2002). Les cellules immunitaires les plus connues pour former des synapses immunologiques (SI) sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les lymphocytes T (LT), les lymphocytes B (LB) et les cellules NK (**Figure I.1**).



**Figure I.1 : Images de microscopie électronique à balayage des synapses formées par les cellules immunitaires.** Observation des interactions spécifiques des LT (vert) avec différentes CPA (orange), LB (images de gauche) ou cellules dendritiques (DC) (image centrale) ou avec des cellules cibles (images de droite) dans des fibres de collagène. Figure adaptée de P.Friedl et al., (Friedl et al., 2005)

La SI permet l'activation de cellules essentielles au déroulement d'une réponse immunitaire efficace. En effet, le système immunitaire est un système très complexe basé sur la mise en place d'un réseau de communication entre des organes (les organes lymphoïdes), des cellules (les cellules hématopoïétiques) (**Figure I.2**) et des facteurs solubles (les chimiokines et les cytokines). La SI se trouve être une structure essentielle à la communication de ce réseau. Le premier rôle qui fut attribué à la SI est la communication entre les deux axes principaux du système immunitaire : l'immunité innée et l'immunité adaptative. La SI formée par la cellule dendritique (DC), une cellule présentatrice d'antigènes et les LT, cellule du système immunitaire adaptatif, constitue une étape clé à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace.



**Figure 1.2 : Développement des cellules hématopoïétiques.** La cellule souche hématopoïétique dans la moelle osseuse se différencie en 2 types de progéniteurs, le progéniteur myéloïde commun (CMP) et le progéniteur lymphoïde commun (CLP). Les plaquettes, les érythrocytes, les monocytes et les granulocytes proviennent du CMP. Les lymphocytes T, B et les cellules NK proviennent du CLP. Toutes ces cellules contribuent à la surveillance du sang en périphérie et des tissus grâce à une sensibilité importante à leur environnement. Figure adaptée de [www.eBioscience.com](http://www.eBioscience.com)

### L'immunité innée

L'immunité innée constitue une première ligne de défense présente en tout point de l'organisme. Cette immunité est qualifiée de naturelle ou non spécifique car elle utilise des



mécanismes de reconnaissance du soi et du non soi qui ne s'adaptent pas aux micro-organismes au cours de l'interaction avec ces derniers. Cette reconnaissance est basée sur des motifs communs à plusieurs pathogènes. Elle fait intervenir un grand nombre de cellules telles que des cellules inflammatoires résidentes (les DC, les mastocytes, les macrophages), et les cellules inflammatoires circulantes (les granulocytes neutrophiles, les granulocytes basophiles et les granulocytes éosinophiles).

### **L'immunité adaptative**

L'immunité adaptative est définie par sa spécificité pour un antigène donné. Cette immunité nécessite plus de temps pour se mettre en place (5 à 8 jours après la première rencontre avec l'antigène) mais constitue une seconde ligne de défense essentielle car elle permet une élimination efficace et spécifique des cellules infectées ou tumorales. La seconde caractéristique majeure de l'immunité adaptative est la création d'une mémoire cellulaire permettant lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène, une réponse plus rapide et plus efficace.

La réponse immunitaire adaptative est définie par deux composantes principales : une réponse cellulaire, basée sur l'action des LT qui coordonnent l'action des cellules immunitaires et détruisent les cellules infectées ou tumorales, et la réponse humorale, basée sur la production d'immunoglobulines par les LB.

Il est important de noter que le système immunitaire initialement catégorisé en 2 types, inné et adaptatif, très brièvement décrit ci-dessus, a conduit aujourd'hui vers la mise en évidence d'une interdépendance de ces 2 systèmes. Il semble ainsi impossible de les considérer comme 2 entités séparées. Ces 2 types d'immunité interagissent finement et mutuellement pour fournir des informations et assistance l'une à l'autre.

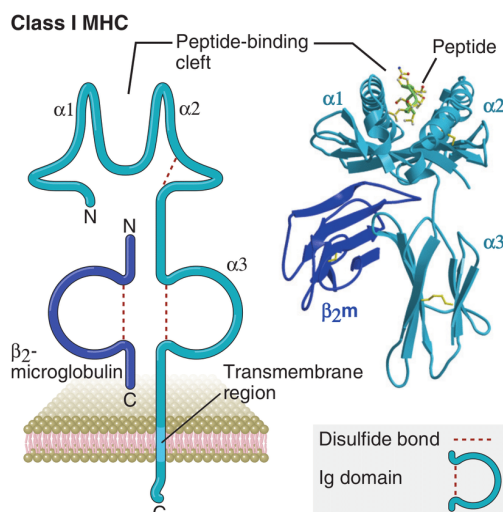
### I.1.a) Organisation génétique et fonctions des molécules de CMH et du TCR

La DC a un rôle de surveillance des tissus, elle est activée par un système de reconnaissance basé sur des motifs partagés par plusieurs pathogènes les PAMP (Pathogen associated molecular pattern), ou des signaux de danger, les DAMP (Damage associated molecular pattern). Ces motifs sont reconnus par la DC par des récepteurs regroupés sous le nom de PRR (Pattern recognizing receptors). L'activation de la DC déclenche alors sa migration dans les organes lymphoïdes secondaires afin d'activer les LT. Les LT ne sont pas adaptés à une reconnaissance de l'antigène natif, ils reconnaissent des fragments antigéniques. L'antigène est donc internalisé par la DC et digéré en plusieurs fragments peptidiques ensuite présentés en surface par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

#### Les gènes du CMH :

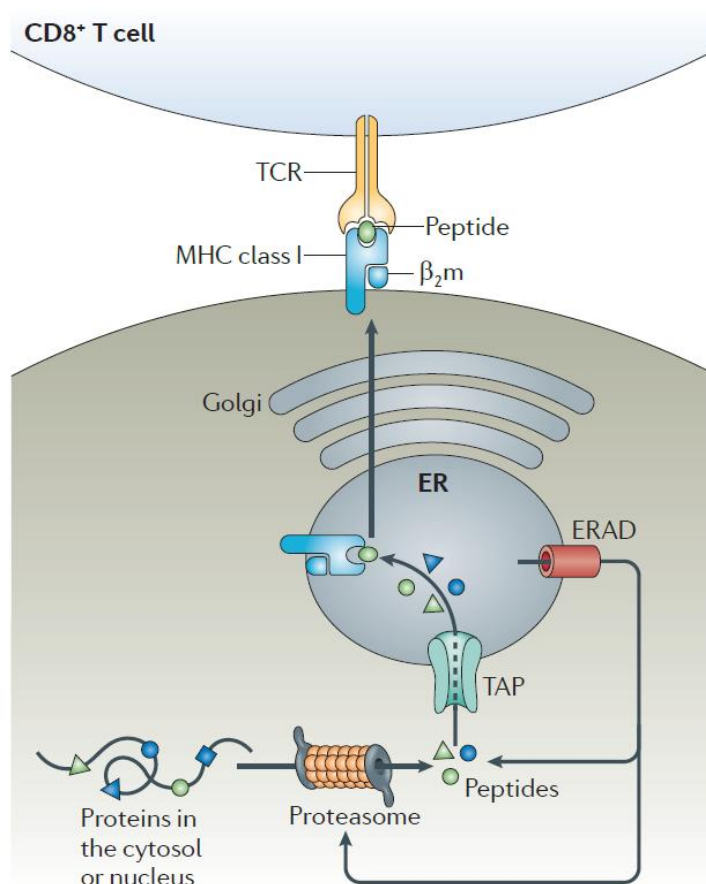
Le système du CMH ou HLA (HumanLeukocyte Antigen) chez l'Homme est un groupe de gènes localisé sur le chromosome 6, organisés en régions codant pour 3 classes de molécules : CMH de classe I, II et III. Le CMH de classe I et II ont une fonction directe dans la présentation antigénique, à l'inverse du CMH de classe III qui code pour différentes protéines impliquées notamment dans la cascade du complément ou l'expression de certaines cytokines telles que le TNF.

Le CMH de classe I regroupe des gènes codant chez l'Homme pour HLA-A, B et C. Il est présent à la surface de toutes les cellules nucléées et permet une activation spécifique des LT  $CD8^+$ . Il est constitué d'une chaîne lourde (chaîne  $\alpha$ ) transmembranaire associée à la  $\beta_2$  microglobuline. Le sillon peptidique formé par les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  de la chaîne  $\alpha$  peut contenir des peptides de 8 à 10 acides aminés (**Figure I.3**).



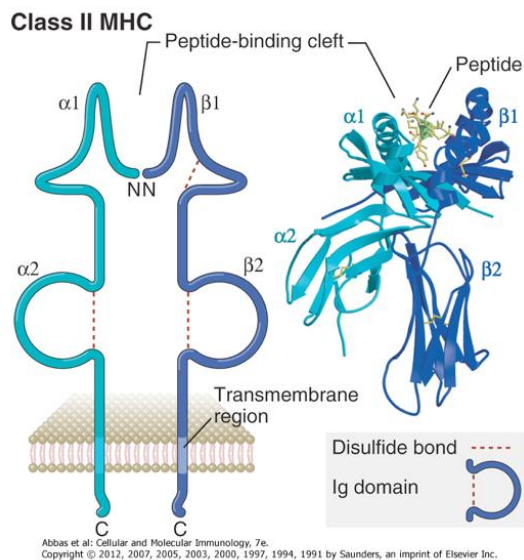
**Figure I.3 : Structure du CMH de classe I.** Figure extraite du livre « Cellular and molecular immunology » Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillal

Le CMH I permet la présentation de peptides issus de protéines endogènes. Un mécanisme appelé la « cross présentation » lui permet également de présenter des protéines issues du milieu exogène (Kurts, 2010). Ces protéines sont du soi ou du non soi. Cette présentation permet à toutes les cellules nucléées d'exposer au système immunitaire le contenu intracellulaire protéique de la cellule. La voie de présentation par les molécules de CMH I se résume par une étape de dégradation des protéines par les protéasomes cytosolique et nucléaire conduisant à la formation de peptides antigéniques de 8 à 10 acides aminés. Ces peptides sont transportés dans le reticulum endoplasmique (RE) par le transporteur TAP (Transporter Associated with antigen Presentation) où ils sont positionnés dans le sillon peptidique des molécules de CMH I. Sans peptide, les molécules de CMH de classe I sont stabilisées par des protéines chaperones telles que la calreticulin, ERp57 et la tapasine. La tapasine interagit également avec TAP, permettant de coupler la translocation du peptide antigénique dans le RE avec sa liaison sur les molécules de CMHI. Le complexe CMHI-peptide (CMHp) ainsi formé est stable, les chaperones sont relarguées et ce complexe quitte le RE pour être présenté à la surface de la cellule (**Figure I.4**) (Vyas, 2008).



**Figure I.4 : Voie de présentation par le CMH de classe I.** Les protéines du cytosol sont dégradées, transportées dans le RE et présentées sur les molécules de CMHI à la surface de la cellule. Figure adaptée de Neefjes et al., 2011.

Le CMH de classe II regroupe des gènes codant chez l'Homme pour HLA-DP, DQ, DR (les molécules de CMHII) et des molécules associées à la présentation antigénique par le CMHI telle que TAP. Il permet l'activation spécifique des LT CD4. Il est constitué 2 chaînes transmembranaires, une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$ , l'association des domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  forment un sillon peptidique pouvant contenir des peptides de 12 à 24 acides aminés (**Figure I.5**).

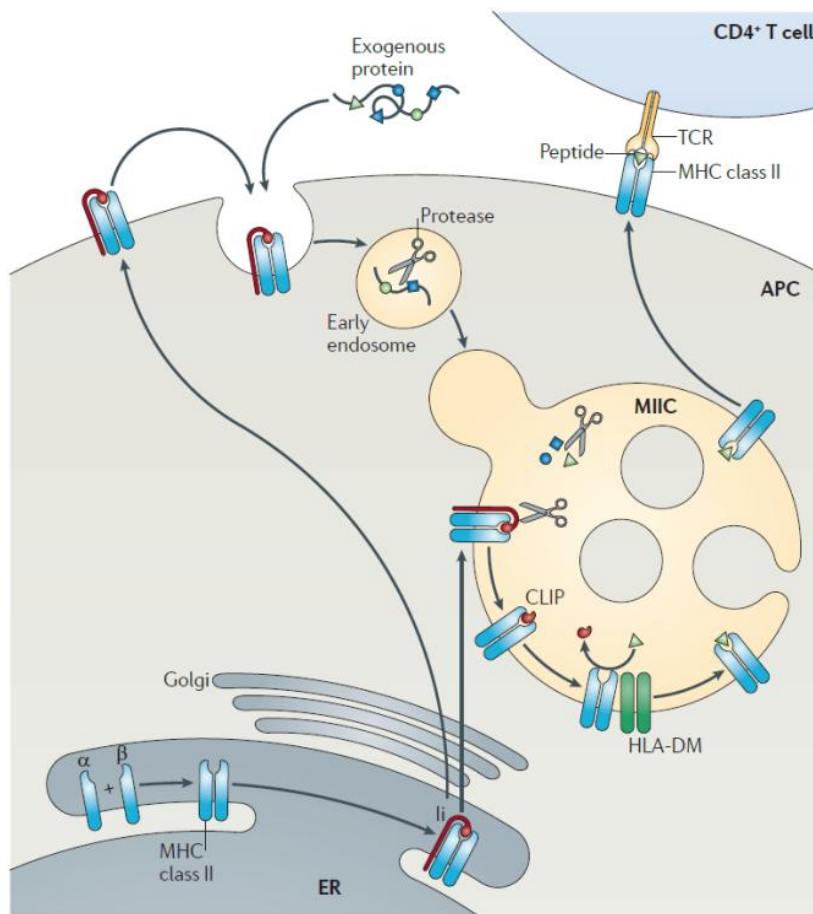


**Figure I.5 : Structure du CMH de classe II.** Figure extraite du livre « Cellular and molecular immunology » Abul K. Abbas, Andrew H.Lichtman, Shiv Pillal.

Le CMH II est exprimé uniquement par les cellules présentatrices d'antigènes dites professionnelles telles que les DC, les macrophages ou les LB. Il permet la présentation de peptides issus de protéines exogènes mais peut également présenter des peptides issus de protéines endogènes lorsque celles-ci ont été dégradé par la voie de l'autophagie (Crotzer, 2010).

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules de CMHII sont assemblées dans le RE et associées à une chaîne invariante (Ii). Ce complexe est ensuite transporté dans un compartiment endosomal tardif appelé le compartiment CMHII (MIIC). La chaîne Ii est ici digérée laissant un résidu de plus petite taille appelé le peptide CLIP (class II associated Ii peptide) dans le sillon peptidique du CMHII. Le peptide CLIP est ensuite échangé par un peptide compatible avec la molécule de CMHII issu de la dégradation de protéines dans la voie d'endocytose. Cet échange nécessite une protéine appelée HLA-DM (**Figure I.6**). Le complexe CMHII-peptide ainsi formé est ensuite présenté à la surface de la cellule. Dans les LB, une protéine HLA-DM modifiée appelée HLA-DO est exprimée et permet de restreindre l'activité de HLA-DM aux

compartiments vésiculaires acides modulant ainsi les peptides présentés par les molécules de CMHII.



**Figure 1.6 : Voie de présentation par le CMH de classe II.** Les protéines endocytées sont digérées dans la voie d'endocytose, les peptides issus de cette dégradation sont chargés sur les molécules de CMHII et exprimés à la surface des CPA professionnelles. Figure adaptée de Neefjes et al., 2011.

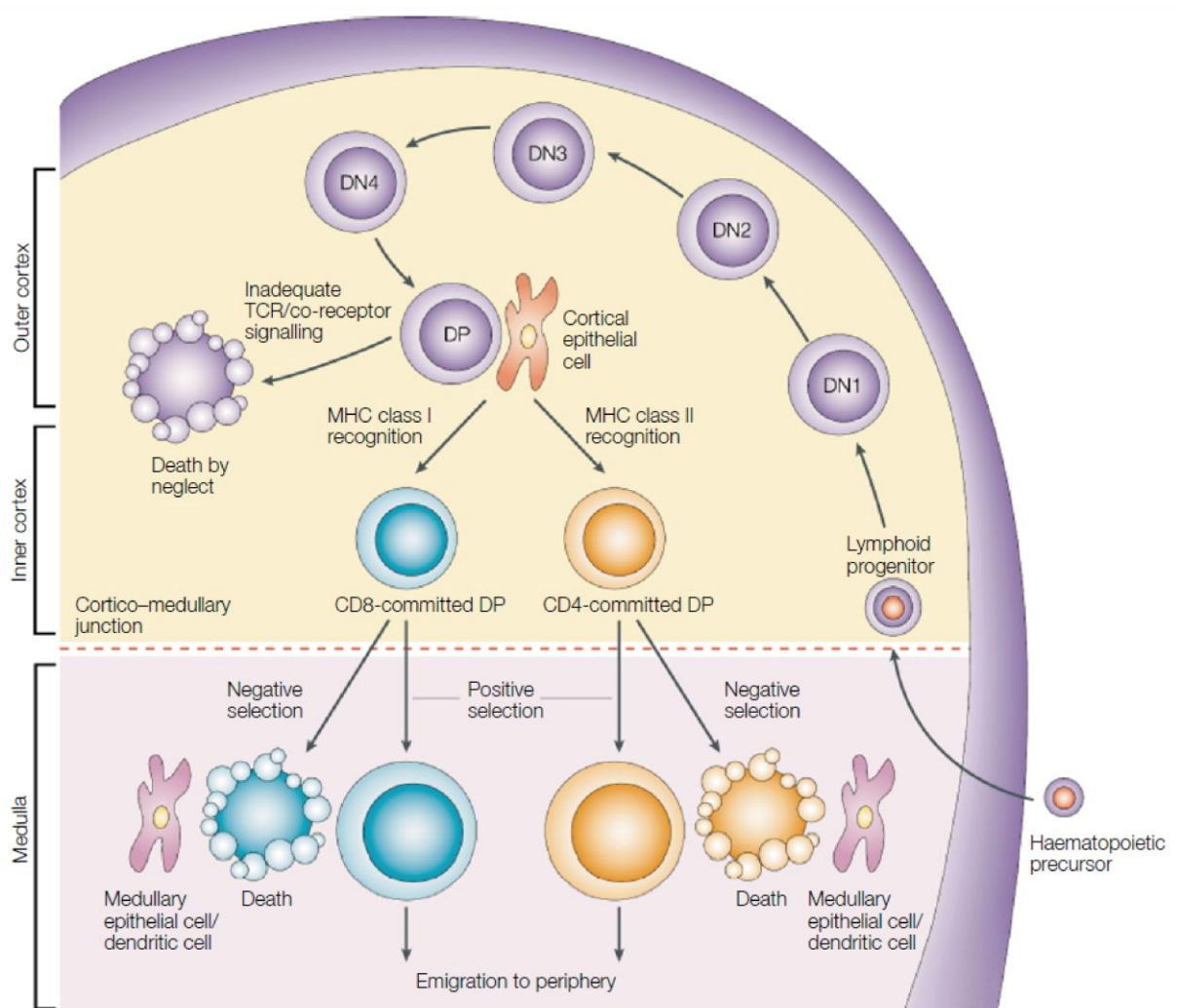
Trois propriétés d'expression des gènes codant pour les molécules de CMH caractérisent leur fonctionnalité : la polygénéité, le polymorphisme et la co-dominance. La polygénéité est définie par les 3 gènes exprimés chez l'Homme pour le CMHI et le CMHII, HLA-A, B, C et HLA-DP, DQ, DR respectivement. De plus, 2 allèles d'un gène de CMH peuvent être exprimés dans une même cellule définissant les caractéristiques de polymorphisme et co-dominance. Ces propriétés permettent à une cellule d'exprimer un grand nombre de molécules de CMH et ainsi une grande amplitude de peptides différents. Ces complexes CMHp sont exclusivement reconnus par le récepteur des lymphocytes T, le TCR (T cellreceptor).

### Organisation génétique et propriétés du TCR :

L'organisation et l'expression des gènes codant pour le TCR lors de la différenciation des LT sont pleinement adaptées à sa fonction de récepteur si particulière. En effet, la

fonction du TCR est complexe puisqu'elle est basée sur la détection de quelques complexes CMHp du non soi présentés par la cellule cible, en présence d'un nombre considérable de complexes CMHp du soi. Chaque LT exprime un TCR unique à sa surface, avec une seule spécificité antigénique, il est donc capable de reconnaître un unique complexe CMH-peptide. Dans le but de reconnaître l'immense diversité de peptides antigéniques, l'évolution a conduit à la mise en place d'un système permettant la formation d'un grand nombre de TCR différents. Ainsi, des réarrangements génétiques aléatoires génèrent des TCR spécifiques d'un seul complexe CMHp. Le réarrangement génétique du TCR se déroule dans le thymus, l'organelymphoïde primaire producteur des lymphocytes T. Nous détaillerons ici uniquement les mécanismes de production des LT portant un TCR  $\alpha\beta$ .

Le thymus est composé de deux zones, le cortex et la médulla, essentielles à la différenciation des LT. Ces zones sont principalement occupées par des cellules T en développement, les thymocytes, et des cellules non hématopoïétiques nécessaires à ce développement, les cellules stromales thymiques. Ces dernières ont des fonctions et phénotypes différents en fonction de leur localisation corticale ou médullaire. Les précurseurs arrivent de la moelle osseuse (ou du foie fœtale) via le sang et entrent dans le thymus par la jonction cortico-médullaire pour migrer dans le cortex. On distingue dans le thymus 4 stades de différenciation des thymocytes caractérisés par l'expression des co-récepteurs CD4 et/ou CD8. Lorsque les précurseurs entrent dans le thymus, ces cellules n'expriment ni CD4 ni CD8, c'est le stade double négatif. Puis ils acquièrent l'expression des 2 molécules, c'est le stade double positif. Pour finir par perdre l'un des co-récepteurs pour devenir un LT CD4<sup>+</sup> naïf ou un LT CD8<sup>+</sup> naïf (**Figure I.7**).

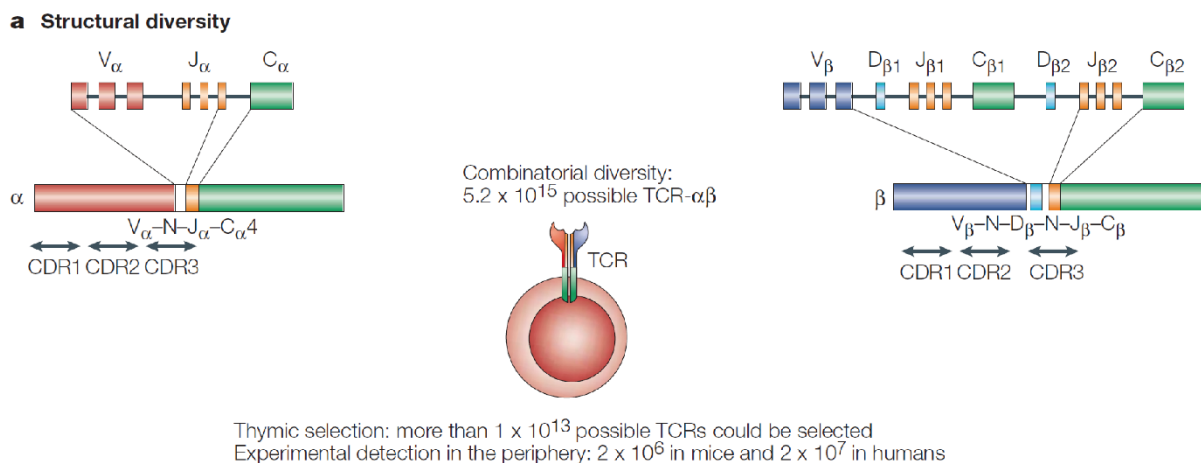


**Figure I.7 : Développement des LT dans le thymus.** Les progéniteurs lymphoïdes communs entrent par la jonction cortico-médullaire. Ils n'expriment ni CD4 ni CD8 c'est le stade double négatif (DN) qui comprend lui-même 4 stades : DN1  $CD44^+CD25^-$  ; DN2  $CD44^+CD25^+$  ; DN3  $CD44^-CD25^+$  et DN4  $CD44^-CD25^-$ . Durant ce stade DN les thymocytes expriment le TCR  $\alpha\beta$  qui interagit ensuite avec les cellules cortico-épithéliales qui expriment de haut niveau de molécules de CMH I et CMH II associées à des peptides du soi. Le devenir des thymocytes dépend alors de la capacité du TCR à reconnaître les molécules de CMH du soi. Une signalisation trop faible conduit à leur mort par anergie. Une signalisation trop forte induit également leur mort, c'est la sélection négative. Le niveau intermédiaire approprié de signalisation du TCR conduit à la maturation des thymocytes, c'est la sélection positive. Les thymocytes qui expriment un TCR capables d'interagir avec les molécules de CMH I deviendront des LT  $CD8^+$  et ceux capables d'interagir avec les molécules de CMH II deviendront des LT  $CD4^+$ . Figure extraite de (Germain, 2002).

Le réarrangement somatique nécessaire à la production d'un TCR fonctionnel commence au stade double négatif. Les gènes codant pour le TCR sont assemblés par des recombinaisons V(D)J via un site spécifique de recombinaisons par une recombinaselymphoïde spécifique (RAG qui comprends RAG1 et RAG2) et des protéines de



réparation de l'ADN ubiquitaires. Les protéines RAG créent des cassures de l'ADN double brin au niveau de séquences signal de recombinaison (RSS) qui encadrent des segments de gènes variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) (**Figure I.7**). Ces ruptures sont ensuite réarrangées par des assemblages non homologues. Les gènes codant pour la chaîne  $\beta$  se réarrangent en premier, un segment D est associé à un segment J puis un segment V est ajouté au segment DJ précédemment produit pour obtenir un segment VDJ. La chaîne  $\beta$  ainsi obtenue est associée à une molécule substitue de la chaîne  $\alpha$ , formant le pré-TCR exprimé à la surface des cellules. Si le réarrangement de la chaîne  $\beta$  est fonctionnel, la cellule prolifère et le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  se met en place. Pour former la chaîne  $\alpha$ , un segment V est associé à un segment J (**Figure I.8**). Il a été estimé que ce type de recombinaison somatique peut permettre la production en théorie de  $10^{15}$  à  $10^{20}$  TCR (Bassing et al., 2002; Nikolich-Zugich et al., 2004).

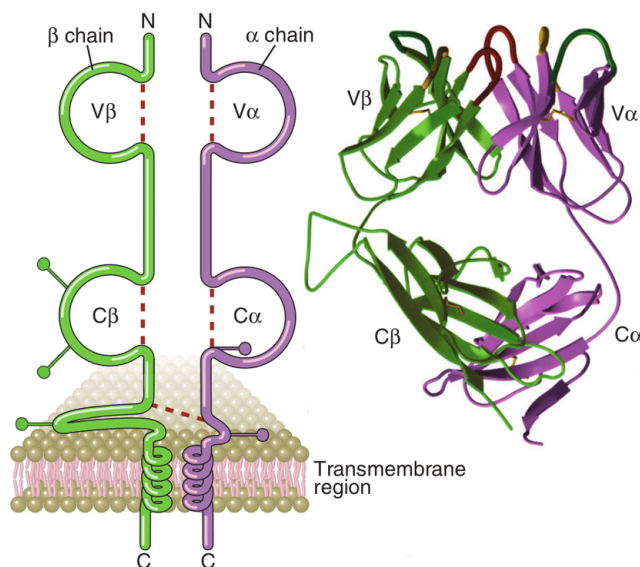


**Figure I.8 : Réarrangement des gènes codant pour la chaîne  $\alpha$  et la chaîne  $\beta$  du TCR.** Les chaînes du TCR ab fonctionnelles sont générées par recombinaisons des segments V, J et D pour la chaîne a et VJ pour la chaîne b, ces segments sont associés à une région constante (C). La diversité de recombinaison est augmentée par l'ajout et la délétion de nucléotides N au niveau des jonctions entre les segments. Figure adaptée de (Nikolich-Zugich et al., 2004).

Les chaînes  $\alpha\beta$  sont des molécules transmembranaires glycosylées liées par un pont disulfure (Garcia et al., 1996; Schumacher, 2002) (**Figure I.9**). Ces glycoprotéines appartiennent à la super famille des immunoglobulines. Elles sont composées d'un domaine extracellulaire en N-terminal qui contient une région variable (V), une région constante (C) et une région charnière courte de résidus cystéines nécessaires à la formation des ponts disulfures (Hedrick et al., 1984). Les régions variables sont composées de 3 CDR (complementarity determining regions). Ces régions hypervariables résultent des



réarrangements somatiques des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR et sont impliqués dans la grande diversité de TCR produits (Arden et al., 1985; Bartok et al., 2010). Les chaînes  $\alpha\beta$  contiennent également un court domaine intracytoplasmique de 4 à 12 acides aminés et un domaine transmembranaire hydrophobe composés de 20 acides aminés positivement chargés permettant de s'associer de façon stable aux molécules CD3 composés de domaines transmembranaires négativement chargés (Rudolph et al., 2006; Schumacher, 2002) (**Figure I.10**).



**Figure I.9 : Structure du TCR**

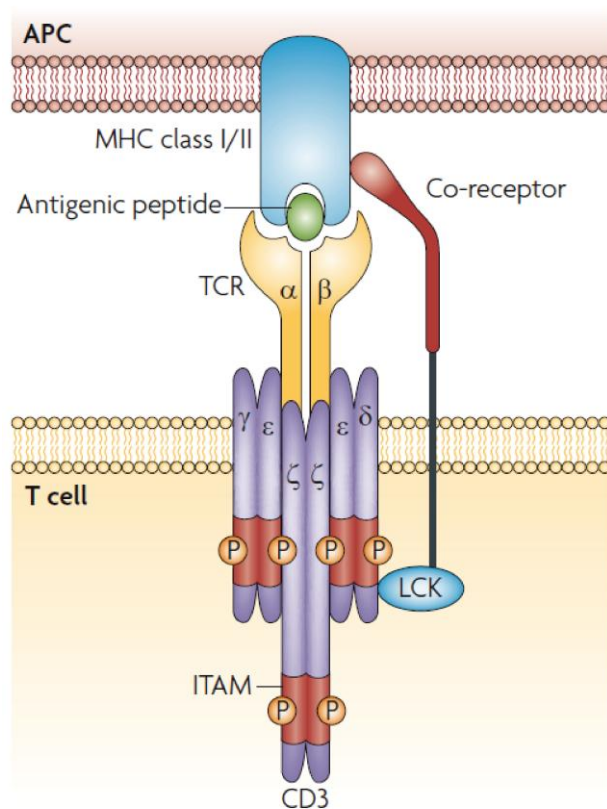
Figure extraite du livre « Cellular and molecular immunology » Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillal

Le TCR fonctionnel ainsi produit est associé à l'expression des 2 co-récepteurs CD4 et CD8 (**Figure I.9**), c'est le stade double positif (**Figure I.6**). A ce stade, les thymocytes sont sélectionnés positivement. Ils migrent vers la médulla grâce à l'expression des chimiokines CCL19 et CCL21 produites par les cellules stromales thymiques médullaire (mTEC) et les macrophages contenus dans la médulla. Dans la médulla, les thymocytes subiront alors une sélection dite négative des LT spécifiques d'antigènes de l'hôte. Si un thymocyte reconnaît un complexe CMHp présenté par les mTEC la cellule activée entre en anergie. Ce système permet l'induction d'une tolérance aux antigènes du soi. La sélection négative conduira ensuite à l'élimination d'un des 2 co-récepteurs pour ne garder que CD4 ou CD8, ce sont les LT simples positifs. Les LT matures quitteront alors le thymus par la jonction cortico-médullaire (Germain, 2002). Ce processus dure quelques jours (**Figure I.7**).

#### **Le complexe TCR et ses co-récepteurs :**

Pour former un complexe de signalisation fonctionnel, le TCR est associé à ses co-récepteurs CD4 ou CD8 et aux molécules de signalisation CD3 (**Figure I.10**). Les molécules

CD8 et CD4 se lient respectivement au CMHI et CMHII présentés par la CPA. Les molécules de CD3 sont composées de 4 sous-unités  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\delta$  associées en homodimères CD3  $\zeta\zeta$  et en hétérodimères CD3  $\epsilon\gamma$  et CD3  $\epsilon\delta$  (Koning et al., 1990). L'association du TCR avec ces 6 chaînes CD3 permet 2 fonctions. D'abord, la région intracellulaire du TCR est très courte et ne possède pas de domaines de transduction du signal, c'est le rôle des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) portés par les chaînes CD3 qui vont initier la transduction du signal après phosphorylation. Chaque chaînes  $\zeta$  porte 3 motifs ITAM alors que les chaînes  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  en porte un seul, 10 motifs ITAM composent ainsi le complexe du TCR. La seconde fonction des molécules CD3 est la stabilisation de l'expression du TCR sur les LT (Koning et al., 1990; Kuhns et al., 2006; Manolios et al., 1991).



**Figure I.10 : Le complexe TCR et ses co-récepteurs.** Le TCR interagit avec les complexes CMHp et les co-récepteurs CD4 ou CD8 stabilisent cette interaction en apportant la kinase LCK à proximité du complexe TCR-CD3. Les molécules CD3 comprennent  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\delta$ . Figure extraite de Gascoigne, 2008.

### I.1.b) L'interaction TCR-CMHp

L'interaction TCR-CMHp a été beaucoup étudiée depuis les années 1990 afin d'élucider le paradoxe du TCR : une forte sensibilité et une faible affinité (Karjalainen, 1994; van der Merwe and Dushek, 2011). Il est aujourd'hui établi que le TCR possède des caractéristiques particulières pour répondre à ce paradoxe.

La première caractéristique est sa sensibilité. Comme évoqué précédemment, l'interaction du TCR avec son ligand fait face à une contrainte majeure : malgré l'expression d'un nombre important de TCR par un LT, la CPA ne présente qu'un faible nombre de complexe CMHp dont le LT est spécifique. Une équipe a montré dans les années 1990 (Demotz et al., 1990) que les LT sont activés par des CPA qui exposent à leur surface environ 0.03% des complexes CMHp spécifique d'un LT parmi tous les complexes CMHp présentés par la CPA. Ainsi, la probabilité pour le TCR de rencontrer le complexe CMHp dont il est spécifique dans la zone de contact entre un LT et une CPA est relativement faible. Cependant, c'est dans cette même étude qu'il a pu être mis en évidence que seulement quelques complexes CMHp suffisent à activer le TCR. Par la suite, des travaux sur la sensibilité du TCR ont permis de montrer qu'un seul complexe CMHp peut permettre d'induire une signalisation calcique dans les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et qu'en maintenant une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  dans le LT, la reconnaissance par le TCR de quelques complexes CMHp est suffisante pour induire l'activation des LT (Irvine et al., 2002; Purbhoo et al., 2004). Il a également été mis en évidence que les CTL sont capables de tuer des cellules cibles exprimant 1-10 complexes CMHp à leur surface (Huse et al., 2007; Jiang et al., 2011; Sykulev et al., 1996; Valitutti et al., 1995). On peut donc parler d'une forte sensibilité du TCR au complexe CMHp dont il est spécifique. Les modèles moléculaires expliquant l'engagement du TCR face à un faible nombre de complexe CMHp seront détaillés page 24.

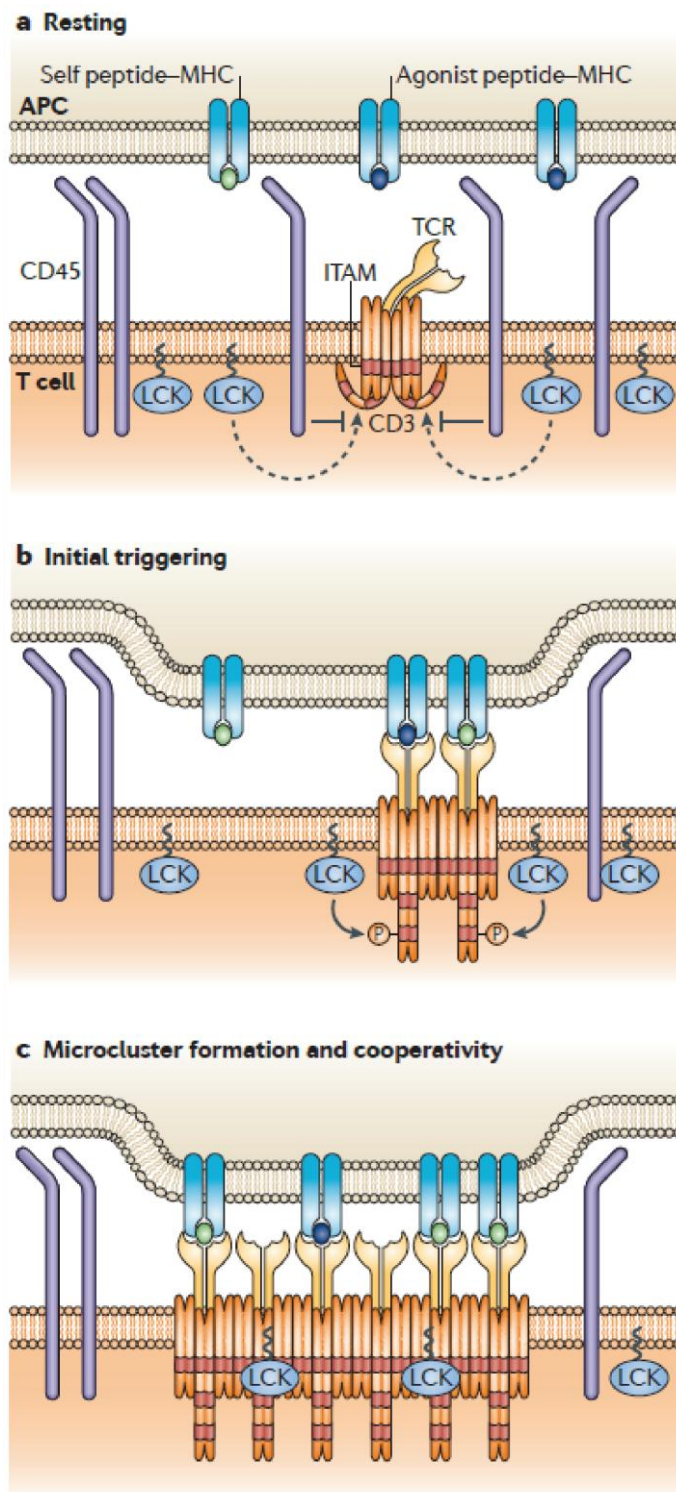
Un deuxième paramètre à prendre en compte est que la CPA présente une quantité abondante de peptide du soi, or dans le thymus les LT ont subi une sélection positive qui vise à sélectionner les LT avec un TCR capable de reconnaître des complexes CMHp du soi (étape nécessaire au test de la fonctionnalité du TCR réarrangé). C'est la sélection négative qui va permettre ensuite d'éliminer les LT avec un TCR de forte affinité pour les complexes CMHp du soi. Donc, les LT périphériques expriment un TCR capable de reconnaître les complexes CMHp du soi avec une faible affinité et il a été montré que cette reconnaissance est nécessaire à la survie des LT périphériques (Ernst et al., 1999; Goldrath and Bevan, 1999; Viret et al.). De plus, le seuil d'affinité pour un complexe CMHp du soi, pour la sélection négative dans le thymus, est proche de l'affinité pour un complexe CMHp du non soi (Palmer and Naehre, 2009). Le LT doit donc discriminer un complexe CMHp du soi d'un complexe CMHp du non soi c'est-à-dire distinguer l'antigène dit étranger à l'important « bruit de fond » de peptide du soi présenté par la CPA. Le mécanisme moléculaire proposé pour

expliquer l'activation d'un LT face à son ligand du non soi en présence de nombreux complexes CMHp du soi est la « coopération » entre les TCR activés. Cette coopération peut être « directe », c'est-à-dire qu'elle implique des interactions entre les TCR et donc la formation d'agrégats de TCR (Chan et al., 2001; Schamel et al., 2006). Cette coopération peut également se faire en aval par une communication des voies de signalisation, un processus appelé « propagation du signal » (Altan-Bonnet and Germain, 2005; Germain and Stefanová, 1999; Štefanová et al., 2003).

Le TCR doit également être versatile. Comme préalablement détaillé, un même TCR engage des réponses effectrices différentes en fonction du signal, un LT mature doit reconnaître des complexes CMHp du soi de faible affinité pour survivre, alors qu'une reconnaissance avec des ligands du non soi conduit à l'activation et la prolifération. Cette propriété « d'adaptation » du signal transduit, en fonction du signal reçu, souligne les propriétés spécifiques du TCR par rapport à d'autres récepteurs.

Enfin, une dernière caractéristique découle de la fonction du TCR. Il n'a jamais rencontré au préalable l'antigène du non soi dont il est spécifique. Malgré l'existence de contacts conservés entre des sous-groupes de TCR avec des segments variables similaires, les contacts et changement de conformation à l'interface de liaison ne sont pas conservés et identiques entre tous les complexes TCR-CMHp (Christopher Garcia et al., 2009; Rudolph et al., 2006). L'engagement du TCR est donc diverse et chaque interaction s'adapte et conduit à une diversité structurelle comme le montre des expériences de mutation sur des résidus CDR qui n'ont pas le même impact sur la reconnaissance TCR-CMHp (Burrows et al., 2010). En accord avec cette diversité, l'engagement du TCR se base sur 3 mécanismes : l'agrégation, le changement de conformation et la ségrégation ou la redistribution des complexes TCR-CD3. P. Anton van der Merwe et Omer Dushek ont suggéré le scénario suivant (**Figure I.11**) (van der Merwe and Dushek, 2011): dans les LT « au repos » une balance existe entre la phosphorylation/déphosphorylation du complexe TCR-CD3 par des kinases/phosphatases constitutivement active (**Figure I.11a**). L'interaction TCR-CMHp conduit à la ségrégation du TCR des autres protéines transmembranaires, ceci entraînant une diminution de l'activité phosphatase et une augmentation de l'activité kinase. Ces mécanismes sont accompagnés de modification de conformations du complexe TCR-CD3 impactant également la susceptibilité à la phosphorylation (**Figure I.11b**). Après un engagement soutenu, les

complexes TCR-CD3 forment des agrégats aussi appelés microclusters contenant 10 à 100 TCR (Figure I.11c).



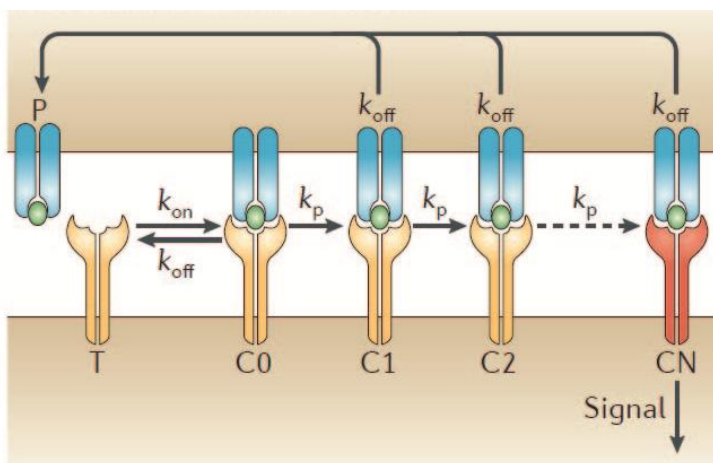
**Figure I. 11 : Modèle d'activation du TCR.** a) En condition basale, le complexe TCR-CD3 est monomérique ou forme des agrégats transitoires. L'activité phosphatase domine et le niveau de phosphorylation des ITAM est faible. b) L'engagement du TCR avec les complexes CMHp induit la ségrégation des complexes TCR-CD3 des phosphatases telles que CD45 et des changements de conformation des domaines cytoplasmiques des complexe TCR-CD3. Ceci entraîne une augmentation de l'activité kinase et une diminution de l'activité phosphatase conduisant à la phosphorylation des ITAM. c) Les complexes TCR-CD3 forment des « microclusters » et la transduction du signal se met en place. Figure extraite de Van der Merwe and Dushek, 2011.

### La probabilité d'interaction :

Comment le TCR est-il activé par un faible nombre de complexe CMHp dont il est spécifique ? Les études menées pour répondre à cette question ont conduit à l'élaboration des 2 modèles décrits ci-dessous.

#### Le modèle d'engagement du TCR basé sur la cinétique d'interaction (« Kinetic proofreading model ») (Figure I. 12)

En 1995, Keithan et ses collaborateurs proposent un modèle où l'activation des LT est proportionnelle au nombre de TCR en interaction avec un complexe CMHp et ceci pour une durée suffisante pour permettre la transduction du signal. Dans ce modèle, les modifications signalétiques telles que la phosphorylation des ITAM des molécules CD3 par LCK sont initiées après des interactions TCR-CMHP et arrêtées et « inversées » dès la dissociation de cette interaction. Ainci, ce modèle suggère qu'il existe un lapse de temps entre l'interaction initiale TCR-CMHP et la transduction du signal. Ce délai permettrait au LT de discriminer les différents ligands CMHp qu'il rencontre : une interaction avec un complexe CMHp non spécifique présentera une vitesse de dissociation élevée pour éviter la formation d'un signal productif. Cependant, ce modèle implique que des antigènes avec un temps de dissociation court ne peuvent induire des réponses équivalentes à celles déclenchées par des antigènes avec une plus longue durée de dissociation. Des données soutiennent de manière indirecte ce modèle par la démonstration qu'il existe une corrélation entre la durée d'interaction TCR-CMHP et l'efficacité biologique de cette interaction (Germain and Stefanová, 1999; Davis *et al.*, 1998; Gascoigne *et al.*, 2001).



**Figure I.12 : « Kinetic proofreading model »**

Ce modèle suggère que la liaison TCR-CMHP entraîne la formation de complexes intermédiaires (C0, C1...) pour finalement former le signal final complet (CN) qui lui induit une signalisation dans le LT. Cependant, si le complexe TCR-CMHP se dissocie avant la formation du CN, il n'y a pas de transduction du signal dans la

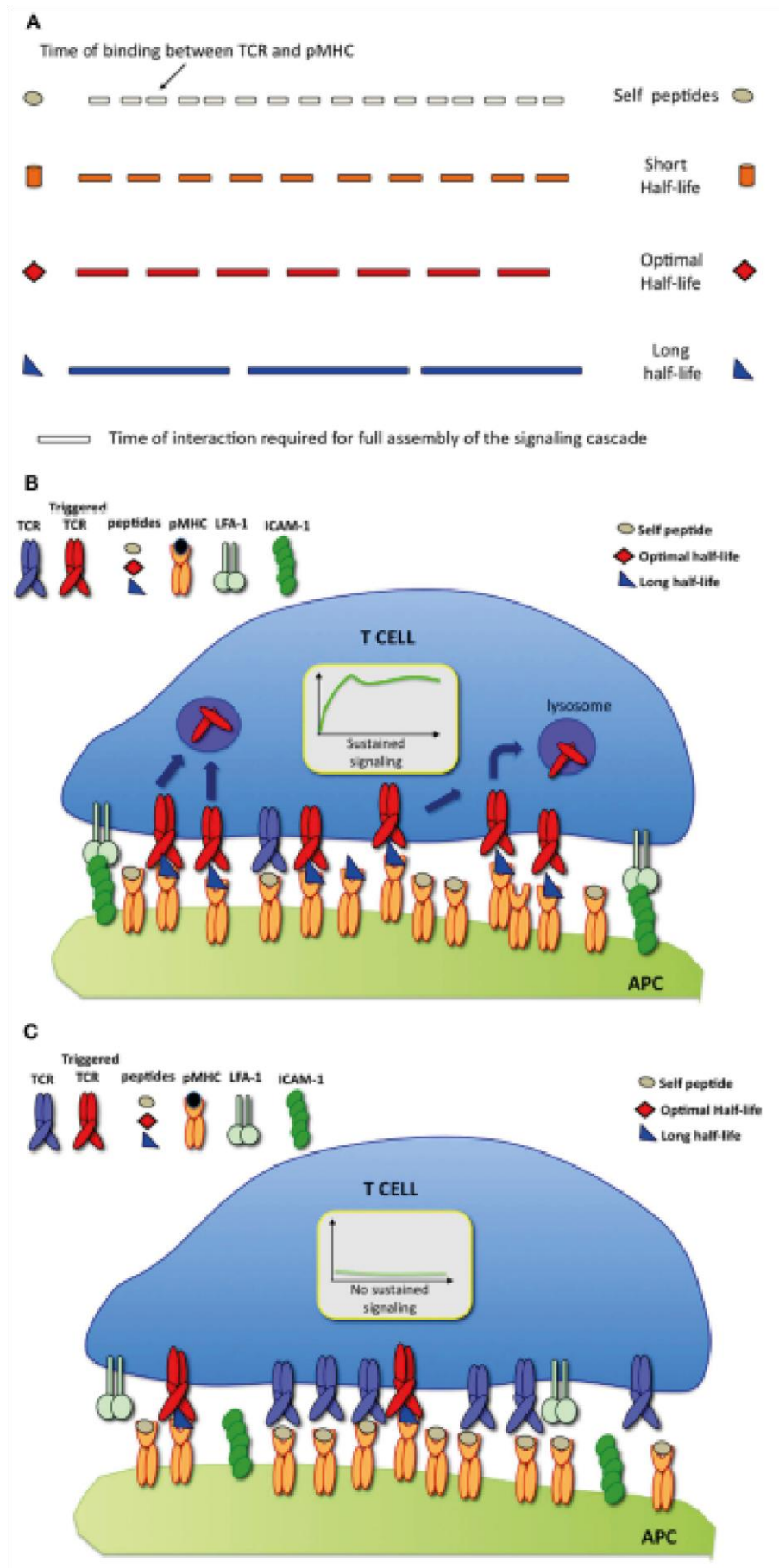
cellule. Le  $k_{on}$  est le temps d'association optimal et le  $k_{off}$  est le temps de dissociation TCR-CMHP optimal. La constante de dissociation  $K_d$  est définie par  $K_d = k_{off}/k_{on}$ . Si le  $K_d=1$  le complexe est stable ( $k_p$ ). Figure adaptée de (Lever *et al.*, 2014).

### L'engagement du TCR en série (Figure I. 13)

En 1995, S.Valitutti *et al.* montrent que l'interruption de l'interaction TCR-CMHp de conjugués LT-CPA par l'ajout d'un anticorps anti CMH II bloque la production d'IFN- $\gamma$  par les LT (Valitutti, *et al.*, 1995). Ils suggèrent alors que l'interaction TCR-CMHp induit un signal soutenu et prolongé dans le LT. Ces observations, en particulier dans le cas d'une concentration antigénique faible conduit ces auteurs à proposer le modèle d'engagement en série du TCR. Ce modèle se base sur le principe suivant : l'activation du TCR par un faible nombre de complexe CMHp passe par un engagement en série de plusieurs TCR par un même complexe CMHp (Valitutti *et al.*, 1995 ; Valitutti *et al.*, 1997; Dushek and Coombs, 2008). Basé sur l'internalisation du TCR comme paramètre révélant une interaction TCR-CMHp, ils ont pu estimer qu'un seul complexe CMHp pouvait engager environ 180 TCR. L'interaction LT-CPA entraîne donc une augmentation du nombre de TCR engagés. L'engagement en série des TCR de faible affinité avec un faible nombre de CMHp permet ainsi un signal soutenu et amplifié qui explique comment un LT peut, avec une forte sensibilité détecter un nombre limité de complexes CMHp.

**Figure I. 13 : Modèle d'engagement en série du TCR (page suivante).** (A) Le modèle d'engagement en série du TCR suppose que les ligands CMHp ont une durée de demi-vie de liaison au TCR optimal, comme un agoniste. (B) A forte densité de complexes CMHp, une durée de demi vie de liaison TCR-CMHp longue entraîne l'engagement en série du TCR et donc stimulation du LT. (C) A très faible densité de complexes CMHp, une longue interaction n'entraîne pas de réponses T.







Les 2 modèles présentés ci-dessus ne sont pas incompatibles. Le modèle d'engagement du TCR basé sur la cinétique d'interaction explique la spécificité d'interaction au niveau moléculaire alors que l'engagement en série du TCR explique davantage la sensibilité du TCR pour la stimulation antigénique au niveau cellulaire. En condition physiologique, il est donc tout à fait envisageable qu'à faible densité de complexes CMHp présentés par la CPA, la demi vie d'interaction de plusieurs TCR-CMHp engagés en série (modèle d'engagement du TCR en série) serait d'une durée suffisamment longue (modèle d'engagement du TCR basé sur la cinétique d'interaction) pour permettre la transduction du signal.

### **L'affinité TCR-CMHp :**

Il a été montré que l'interaction TCR-CMHp est de relativement faible affinité avec un  $K_D$  entre 1 et 100 $\mu$ M (Davis et al., 1998; Matsui et al., 1991). Ces données semblent paradoxales par rapport aux nombreuses études, notamment celles sur les modèles d'engagement du TCR précédemment décrits qui montrent qu'un signal soutenu est nécessaire à la transduction du signal (Huppa et al., 2003). Un des enjeux de l'étude de l'interaction TCR-CMHp est donc de comprendre quels paramètres parmi l'interaction TCR-CMHp elle-même, la constante de dissociation ( $K_D$ ) ou la demi-vie du TCR détermine l'activation du LT (Stone et al., 2009).

L'interaction TCR-CMHp aussi appelé le paramètre « d'occupation » du TCR est de fait nécessaire à l'initialisation du signal TCR. Le modèle d'engagement du TCR en série montre également que la constante de dissociation doit être relativement rapide pour permettre à plusieurs TCR de se lier sur un même complexe CMHp. De plus, il a été montré que la demi-vie, la cinétique d'interaction, du TCR-CMHp joue également un rôle majeur dans la signalisation du TCR. Kersh et al. ont mis en évidence qu'un ligand avec un même  $K_D$  mais une demi vie différente pouvait déclencher des transductions du signal différentes (Kersh et al., 1998). Des études *in vivo* ont également confirmé que la demi vie d'interaction TCR-CMHp peut significativement moduler l'activation des LT (Carreño et al., 2007).

De ces observations découlent l'hypothèse intégrant à la fois le  $K_D$  et la demi-vie : il existerait un temps de contact optimal entre le TCR-CMHp qui suivrait une courbe gaussienne autour du temps de demi-vie. Les complexes avec des taux de dissociation trop rapide ou trop

longse situeraient aux extrémités de la courbe gaussienne entraînant une réduction de l'activité du TCR(Carreño et al., 2007; Kalergis et al., 2001).

En corrélation avec la forte sensibilité du TCR à son ligand illustré par sa capacité à être activé par seulement quelques complexes CMHp, il a été montré une forte spécificité du TCR pour son ligand. En effet, un complexe CMHp donné peut avoir un effet agoniste déclenchant une activation complète des LT, tandis que d'autres peptides auront un effet agoniste faible voir nul n'entraînant pas ou partiellement l'activation du LT (Rabinowtiz et al., 1996 ; Kersh et al., 1998).

Pour conclure, il est difficile de corréler l'affinité du TCR avec l'efficacité de réponse des LT. La réponse déclenchée par la signalisation TCR-CMHp est un processus complexe qui peut être influencé par la cinétique de l'activation, les rétrocontrôles négatifs, la signalisation et la dose d'antigène. Or l'étude de la variation d'un seul des paramètres sans en modifier les autres est complexe.

#### **Force de contact :**

La migration des LT sur le site infectieux ou tumoral, l'interaction avec leur cellule cible, sonder leur antigène, réorienter les organelles, sécréter des cytokines ou molécules cytotoxiques, toutes ces étapes nécessitent l'implication de forces mécaniques(Harrison et al., 2019). Nous nous concentrerons sur les forces mécaniques générées lors de la formation d'une SI. Ces forces sont dites internes puisque générées par l'adhésion cellulaire, la tension membranaire et la contraction du cytosquelette.

Plusieurs études ont suggéré que le TCR est un mécano senseur, le LT est ainsi sensible aux forces mécaniques(Das et al., 2015; Kim et al., 2009; Ma et al., 2012). Il a notamment été montré que les forces contrôlent mécaniquement la signalisation calcique et la sécrétion d'IL-2 lors des interactions LT-DC (Lim et al., 2011). Des forces mécaniques générées par le clustering (ségrégation) du TCR ou les mouvements de l'actine sont aussi impliquées dans la reconnaissance du TCR et sa signalisation (Bashour et al., 2014). De plus, les forces mécaniques régulent la cinétique de liaison du complexe TCR/pMHC et augmentent la sensibilité de reconnaissance (Feng et al., 2017; Hong et al., 2015). Un type de lien appelé « lien de capture » a été identifié comme un mécanisme important de discrimination par le TCR du ligand dont il est spécifique parmi ceux rencontrés (Das et al., 2015; Hong et al., 2015; Liu et al., 2014). Le lien de capture a été initialement proposé en 1988 et

finalemment observé par Zhu et al en 2003 (Dembo et al., 1988 ; Marshall et al., 20003). Ces derniers ont montré que des forces régulent la durée de vie et les niveaux d'activation des LT CD8<sup>+</sup> de façon peptide dépendante. Après liaison, les forces générées par l'environnement cellulaire entraîne la formation de ces « liens de capture » permettant de stabiliser l'interaction TCR-pCMH.

Les forces mécaniques sont donc impliquées dans la SI dans son ensemble. Il serait aujourd'hui intéressant d'étudier comment ces forces sont altérées par des molécules utilisées en thérapie qui agissent au niveau de la SI, telles que les Ac bloquant les immune checkpoint par exemple.

### **I.1.c) La transduction du signal par le TCR**

L'engagement du TCR déclenche la formation d'un signalosome composé de multiples molécules conduisant au recrutement de seconds messagers et à l'activation de plusieurs cascades de signalisation qui contrôlent de nombreuses fonctions des LT (Gorentla et al., 2012) (**Figure I.14**). La signalisation du TCR est très rapide et peut précéder la formation d'une SI (Lee et al., 2002; Wiedemann et al., 2006).

Comme précédemment indiqué dans le chapitre I.1.a, la structure du TCR ne permet pas d'induire une signalisation, son association aux molécules CD3 pour former le complexe TCR-CD3 est nécessaire. Ce sont les ITAM des molécules CD3 qui permettent d'initier la transmission du signal par phosphorylation des résidus tyrosines par LCK, une tyrosine kinase de la famille Src (Samelson et al., 1986 ; Letourneur et al., 1992; Letourneur et al., 1992; Veillette et al., 1988). La phosphorylation des ITAM entraîne le recrutement de la protéine tyrosine kinase ZAP70 qui se lie spécifiquement sur les phospho-tyrosines des ITAM (Chan et al., 1992). ZAP-70 est à son tour activée par phosphorylation par Lck (Wang et al., 2010). Puis ZAP-70 phosphoryle une protéine adaptatrice clé : LAT (Linker for the activation of T cells) (Zhang et al., 1998). Cette phosphorylation génère des sites de liaison pour le recrutement d'autres protéines adaptatrices telles que GADS, GRB2, SLP76, ADAP (Wardenburg et al., 1996; Liu et al., 1999; Wang et al., 2004) et le recrutement (soit directement sur LAT phosphorylé, soit indirectement sur des protéines adaptatrices) de molécules de signalisation effectrices telles que VAV1 et PLCγ1 (Bunnell et al., 1999; Beach et al., 2007; Dombroski et al.,

2005). Ce complexe forme le signalosome multimoléculaire LAT (Hořejší et al., 2004) (**Figure I.14**).

VAV1 induit ensuite la réorganisation du cytosquelette d'actine par l'activation des GTPases de la famille Rho telle que RAC et cdc42 (impliquée dans la division cellulaire et la migration). PLC $\gamma$ 1 hydrolyse PIP2 pour former 2 seconds messagers majeurs, IP $_3$  et DAG, à l'origine de 3 voies de signalisation conduisant à l'activation et/ou à la translocation nucléaire de plusieurs facteurs de transcription clés (Zhong et al., 2008) (**Figure I.14**). Ces 3 voies sont :

- La voie des MAPK qui comprend la voie ERK1/ERK2-AP1, la voie JNK-JUN et la voie p38-FOS

La voie des MAPK (mitogen activated protein kinase) est très conservée dans l'évolution et ubiquitaire. Il y a 3 groupes de MAPK, Erk 1 et 2, p38 MAPK et JNK, chacune activée en amont par différentes MAPK kinases. En fonction du groupe de MAPK activé, différents facteurs de transcription sont stimulés permettant à la famille de MAPK de réguler l'expression de multiples gènes impliqués dans de multiples fonctions effectrices des LT.

- La voie PKC $\theta$ -IKK-NF $\kappa$ B

La PKC est rapidement recruté à la SI de façon antigène spécifique. La famille des PKC compte 10 isoformes structurellement liées et fonctionnellement groupées en 3 sous familles basées sur la composition de leur domaine régulateur et leur nécessité de cofacteurs (Pfeifhofer-Obermair et al., 2012) : les PKC conventionnelles (cPKC :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), les nouvelles PKC (nPKC :  $\delta$ ) et les PKC atypiques. Les nouvelles PKC sont DAG dépendantes mais Ca $^{2+}$  et phospholipides indépendantes pour leur activité (Rosse et al., 2010). Six PKC ont été retrouvées exprimées dans les LT et il a été montré que différentes isoformes de PKC sont nécessaires pour différents aspects de l'activation et les fonctions effectrices des LT (Meller et al.). PKC $\theta$  est l'une des protéines la plus connues pour être recrutée à la SI et s'accumuler au niveau du cSMAC après l'engagement du TCR de façon dépendante de CD28 (Monks et al., 1997). Des équipes ont également montré que la PKC $\zeta$  (PKC atypique) est un acteur moléculaire clé dans la polarisation des Th vers les DC (Bertrand et al., 2010; Tourret et al., 2010)

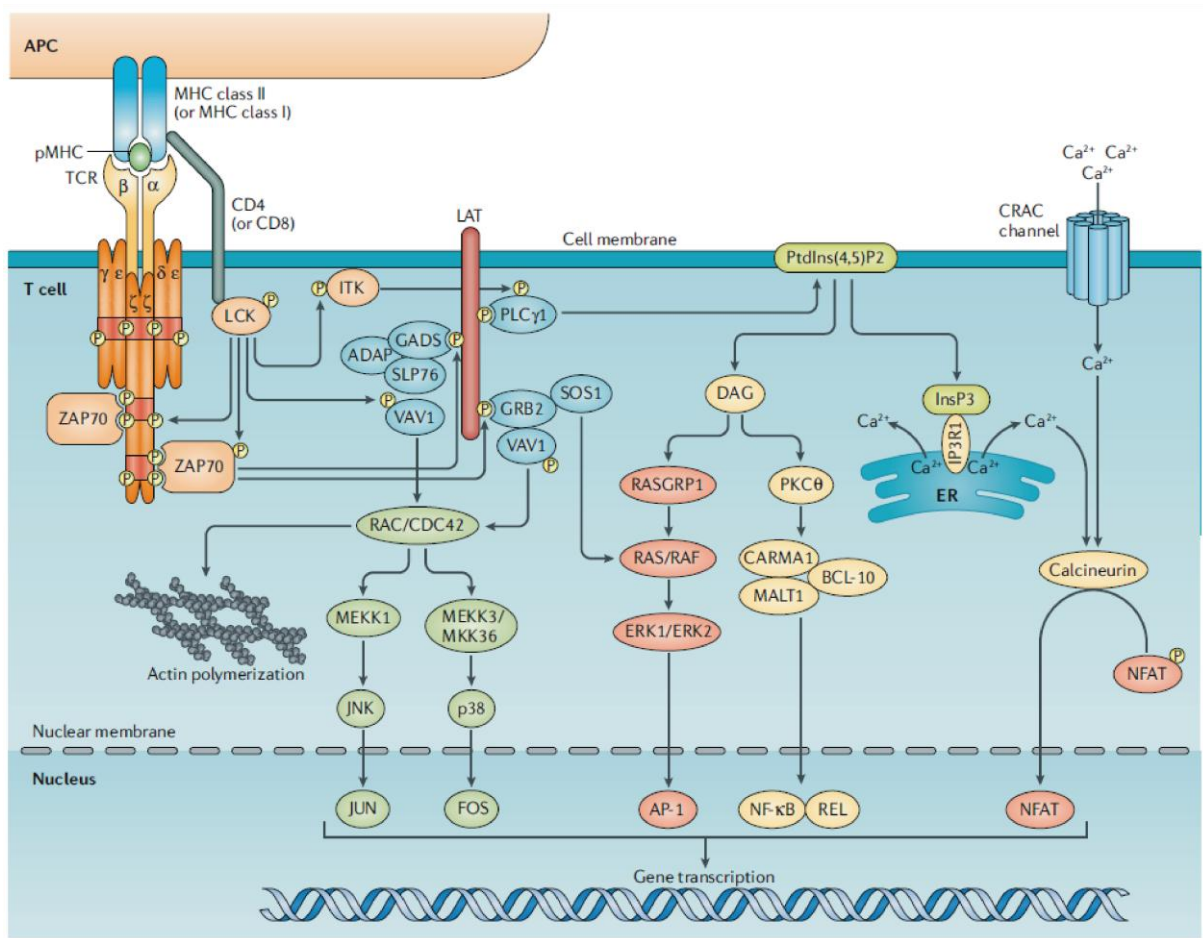
- La voie IP $_3$ -Ca $^{2+}$ -NFAT :

Le Ca $^{2+}$  a pour rôle d'induire la translocation de NFAT dans le noyau via la calcineurine (**Figure I.14**). Après interaction TCR-CMHp, une augmentation rapide de [Ca $^{2+}$ ] $_i$  dans les LT est

induite (Donnadieu et al.). Huse et al ont montré que cette signalisation peut être observé dès les 6 premières secondes après l'interaction TCR-CMHp (Huse et al., 2007).

En plus de son rôle décrit dans les fonctions effectrices des LT et notamment dans la production de cytokine, l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  a un impact sur le « signal stop » des LT. En effet, lorsque les LT « scannent » les CPA à la recherche de leur antigène, les LT sont très mobiles et de forme allongée caractéristique de cette mobilité. L'interaction TCR-CMHp conduit à un arrêt de la cellule qui s'arrondit et enrichit les molécules de signalisation à la zone de contact (Donnadieu et al., 1994). L'arrêt de la cellule est précédé d'une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ . L'altération de cette augmentation entraîne l'inhibition du « signal stop ». Il a notamment été montré que l'arrêt de la cellule nécessite l'activation de la calpaine, une protéase calcium dépendante qui libère LFA-1 de son ancrage au cytosquelette, permettant à LFA-1 de former des clusters à la zone de contact, fondamental au maintien et à la stabilisation du contact intercellulaire (Feske, 2007; Randriamampita and Trautmann, 2004).

Les voies de signalisation décrites ci-dessus sont donc essentielles à l'induction des fonctions effectrices des LT. En plus de l'activation de ces voies, plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Il a notamment été montré qu'une signalisation soutenue de la voie  $Ca^{2+}$  et PKC $\theta$  est requise pour la production de cytokines et l'induction de la prolifération (Timmerman et al., 1996; Fabre et al., 2005; Zanin-Zhorov et al., 2011). De plus, il est aujourd'hui admis qu'en plus de la durée de signalisation, l'intensité et la fréquence des oscillations de signaux sont d'importants facteurs modulant le devenir des réponses T (Dolmetsch et al., 1998; Utzny et al., 2005).



**Figure I. 14 : La transduction du signal par le TCR.** La transduction du signal par le TCR est déclenchée par son interaction avec un complexe CMHp. Ceci entraîne le recrutement des kinases Lck et ZAP70 qui permet la phosphorylation de la protéine adaptatrice LAT. LAT forme ensuite un complexe de signalisation permettant d'activer les 3 voies de signalisation majeure du TCR : la voie des MAPK (qui comprend la voie ERK1/ERK2-AP1, la voie JNK-JUN et la voie p38-FOS), la voie PKCθ-IKK-NFκBet la voie IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>-NFAT. Figure extraite de (Gaud et al., 2018)

### Les molécules de co-stimulation et co-inhibition :

Les molécules de co-signalisation colocalisent avec le TCR et peuvent moduler la transduction du signal du TCR positivement ou négativement. Elles jouent un rôle crucial dans l'activation des LT, leur différenciation, leurs fonctions effectrices et leur survie.

Les molécules de co-signalisation comprennent des groupes de 2 familles de molécules : la super famille des Ig (IgSF) et la famille des récepteurs au TNF (TNFRSF).

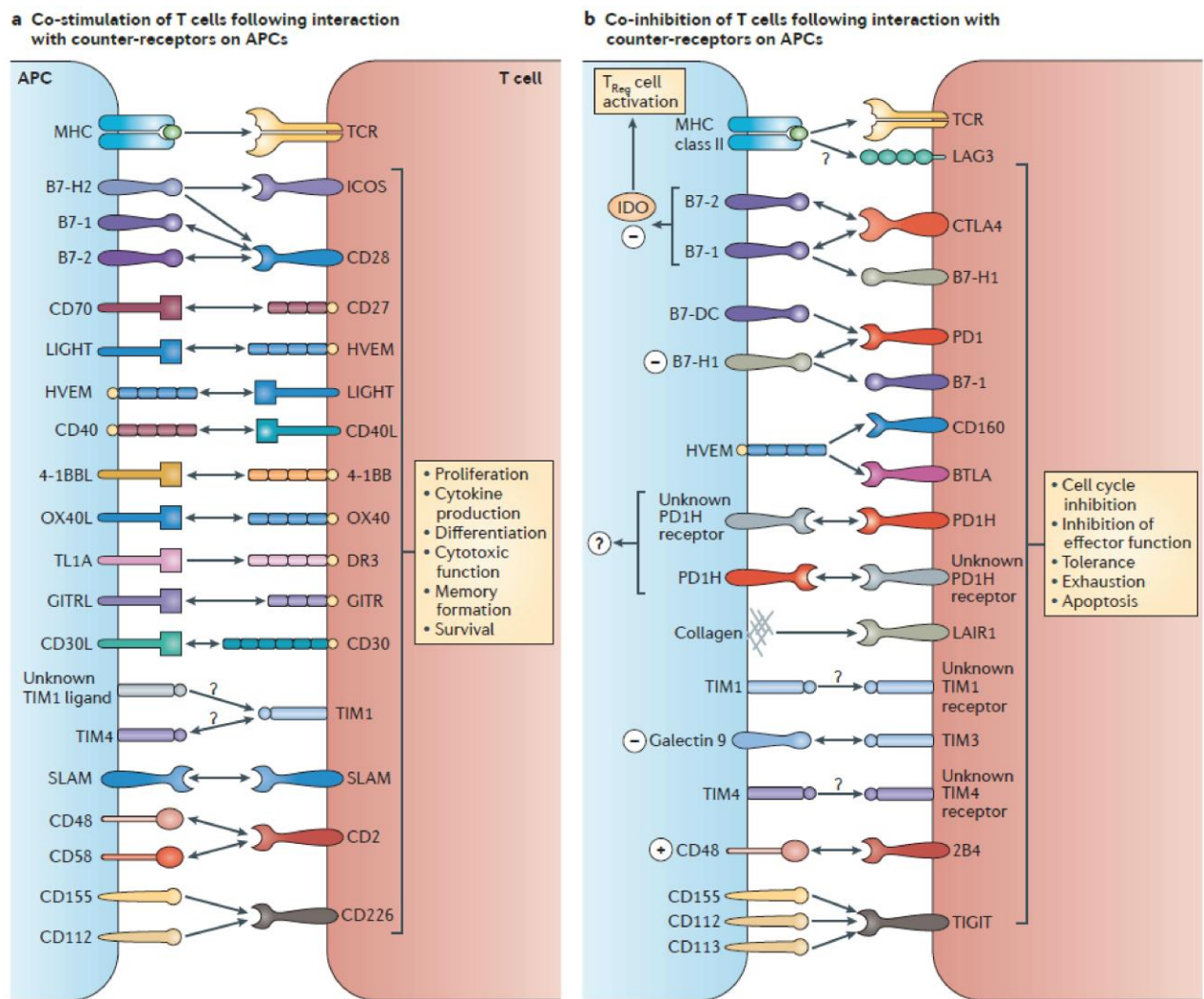
Les molécules de co-signalisation les plus connues sont CD28 qui interagit avec les molécules de la famille B7. CD28 est constitutivement exprimé à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> et apporte un signal de co-stimulation essentiel à la prolifération, la survie des LT et l'induction de la production de cytokine (Linsley, 1991; Thompson et al., 1989). Il se lie à ses ligands B7-

1 (CD80) et B7-2 (CD86) sur la CPA. Son homologue inhibiteur est CTLA-4. Il est induit après activation des LT et inhibe la signalisation LT. Il est stocké dans des vésicules intracellulaires et est exposé en surface après activation des LT. Quand l'expression de CTLA4 membranaire est augmentée, celle de CD28 est diminuée par endocytose (Rudd et al., 2009). Du côté de la CPA, l'expression de B7-1 et B7-2 peut également être modulée. B7-2 est constitutivement exprimée par les CPA à faible niveau. L'activation de la CPA induit la transcription, traduction et translocation à la surface des molécules B7-1 et B7-2 (Hathcock, 1994; Inaba, 1994).

Il a été suggéré que CD80 serait un ligand préférentiel de CTLA4. CD86 et CD28 étant constitutivement exprimés, leur interaction est plus probable dès le contact LT-CPA. CTLA4 génère ensuite un signal inhibiteur impliqué dans l'arrêt de la signalisation et l'induction de l'anergie (Tivol et al., 1995; Walunas et al., 1994).

Il existe un large éventail de molécules de co-signalisation qui ne seront pas toutes décrites en détail ici mais illustrées dans la **Figure I.15**. La signalisation par les récepteurs de co-stimulation ou co-inhibition est régulée par le contrôle spatiotemporel de l'expression de ces récepteurs qui peut être modulé après l'engagement du TCR. Le modèle de co-signalisation du TCR a été décrit comme « le modèle de co-signalisation de la marée ». Selon ce modèle, la SI est comparable à une marée montante caractérisée par une forte expression des récepteurs de co-stimulation. La SI mature représente la marée maximale puis la marée redescend et l'expression des récepteurs de co-stimulation diminue pour laisser place à l'expression des récepteurs de co-inhibition (Zhu et al., 2011).

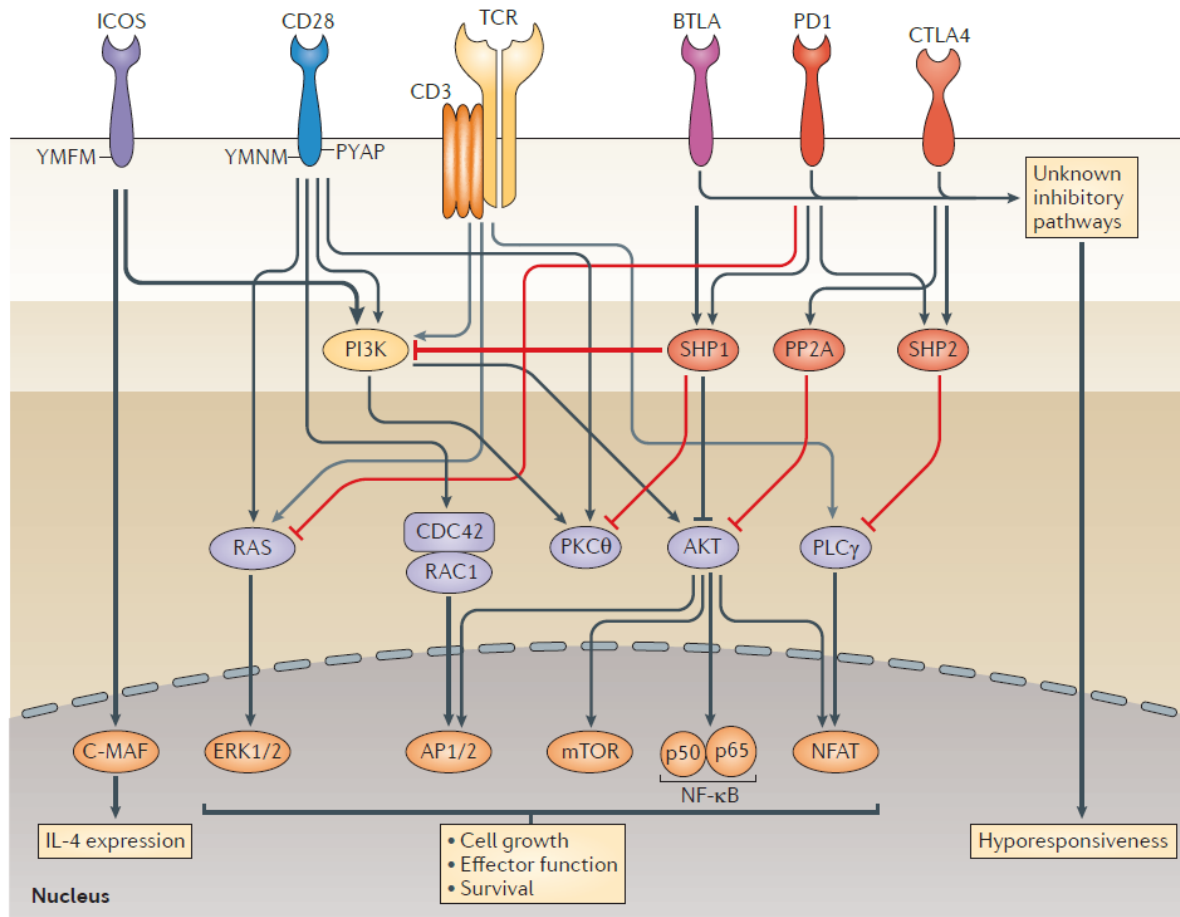
Il est intéressant de souligner le nombre important de ces molécules aujourd'hui très étudiées dans le cadre du développement de nouvelles immunothérapies qui visent à potentialiser l'activité des LT par l'inhibition des molécules de co-signalisation inhibitrice du TCR (Xia et al., 2019).



**Figure I.15 : Diversité des molécules de co-signalisation stimulatrice ou inhibitrice. (a)** Les molécules de co-stimulation délivrent des signaux positifs suite à l'engagement du TCR avec son ligand présenté par la CPA. **(b)** Les molécules de co-inhibition délivrent des signaux négatifs suite à l'engagement du TCR. Une fine régulation de l'expression à la surface de l'ensemble de ces molécules détermine la nature du signal transduit dans les LT. Figure extraite de Chen and Flies, 2013.

Les mécanismes d'action des récepteurs inhibiteurs tels que CTLA4 et PD-1 sont représentés **Figure I. 16**. Ces mécanismes sont particulièrement intéressants à comprendre car au cœur du développement ces dernières années d'immunothérapies anti-tumorale prometteuses qui seront détaillés dans le chapitre I.5.b du manuscrit. Ces molécules sont recrutées à la SI et inhibent la transduction du signal positive par la déphosphorylation de molécules de signalisation essentielles à l'activation du TCR via le recrutement de phosphatases telles que SHP1 et SHP2 (**Figure I. 16**)(Patsoukis et al., 2012; Riley, 2009; Yokosuka et al., 2012).

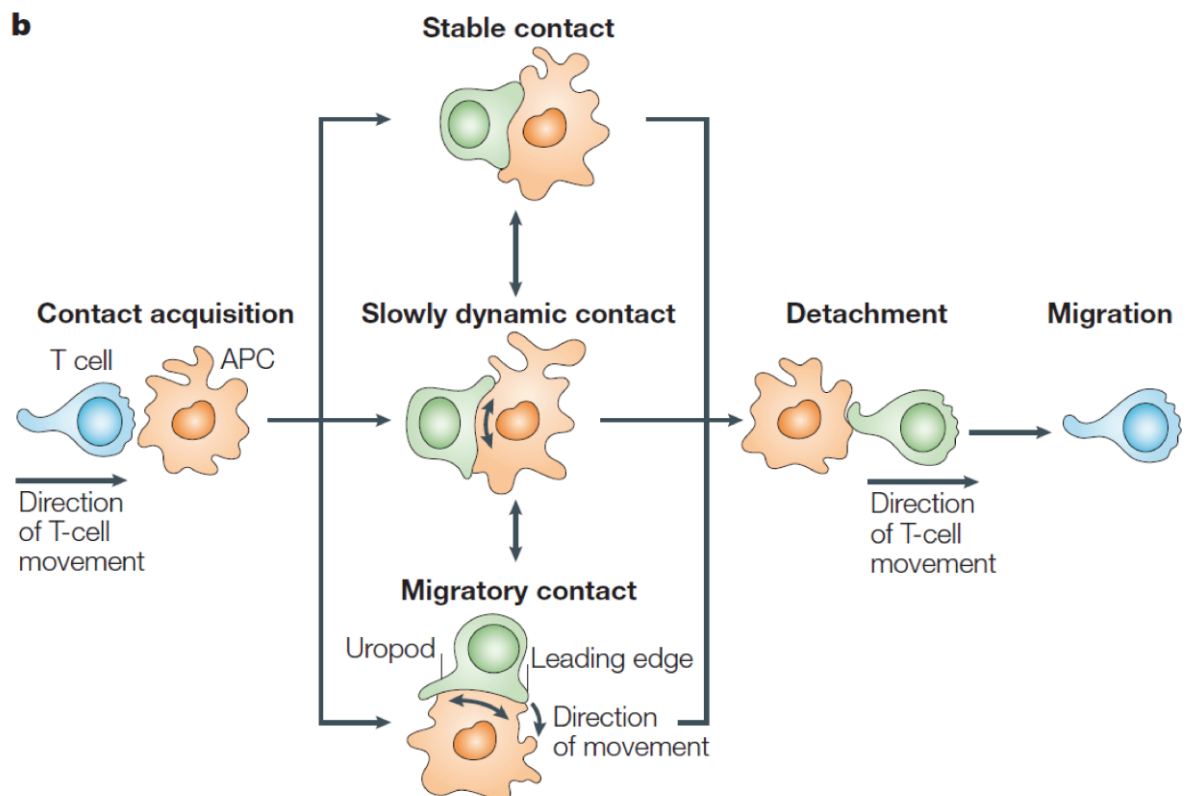




**Figure I.16 : Voies de signalisation co-stimulatrice ou co-inhibitrice des récepteurs de la famille CD28.** L'activation des complexes TCR-CD3 et CD28 induit l'activation de ICOS (inducible T cell co-stimulator). CD28 s'associe avec des molécules de signalisation par des motifs YMN et PYAP pour co-stimuler plusieurs voies majeures d'activation des LT, de prolifération, des fonctions effectrices et de la survie. ICOS contient des motifs YMFM qui recrutent PI3K conduisant à une signalisation AKT. ICOS induit aussi IL-4 par la voie C-MAF. Les molécules de signalisation co-inhibitrices telles que BTLA (B and T lymphocyte attenuator), PD1 (programmed cell death 1), et CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) diminuent l'activation des LT via le recrutement de phosphatases telles que SHP1 et SHP2 (SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 1) et PP2A (serine/threonine protein phosphatase 2A). Ces phosphatases déphosphorylent plusieurs complexes majeurs de signalisation. PD1 peut également inhiber la voie ERK. Figure extraite de Chen and Flies, 2013.

#### I.1.d) La synapse immunologique LT-CPA

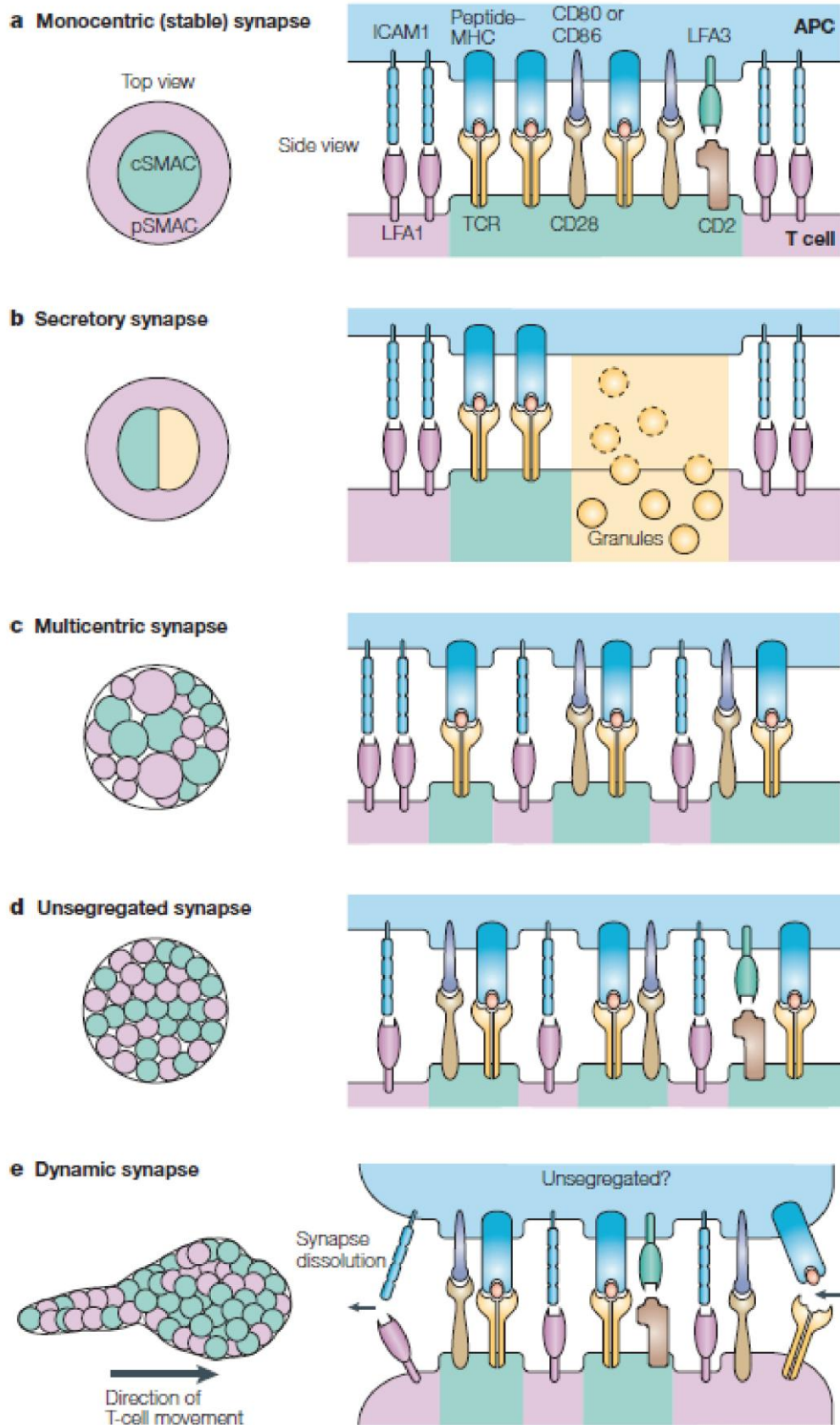
L'interaction LT-CPA comprend 3 phases : l'initiation du contact et la recherche de l'antigène, « l'attachement » du LT durant quelques minutes ou quelques heures d'interaction (la durée et la stabilité du contact seront déterminant pour le devenir des cellules) et enfin le détachement et la migration du LT (**Figure I.17**).



**Figure I. 17 : Schéma des 3 phases de l'interaction LT-CPA.** Schéma des phases d'interaction des LT avec une CPA. Le LT scanne la CPA puis le contact est acquis pour être ensuite dissous. Le LT migre vers les tissus en fonction du signal reçu. L'interaction implique toujours des contacts entre les 2 membranes des 2 types cellulaires mais la stabilité et la dynamique de cette interaction peut être très variable. Les LT ayant reçu un signal sont représentés en vert. Figure extraite de Friedl et al., 2005.

Il est aujourd'hui établi que lors de l'interaction d'un LT avec une CPA le type d'information et la quantité échangés dépend de la durée et de la dynamique de l'interaction (dynamique ou stable), de l'intensité du signal (faible ou fort) et de la présence d'évènement de sécrétion (Friedl et al., 2005).

Cinq structures moléculaires différentes peuvent être formées par un LT et une CPA pour transmettre une information (**Figure I.18**).



**Figure I. 18 : Diversité des zones d'interaction moléculaire à la SI.** Cinq types d'arrangement moléculaires de la SI sont représentés : **(a)** La SI stable ou monocentrique **(b)** La SI sécrétrice ou effectrice **(c)** La SI partiellement ségrégée ou multicentrique **(d)** La SI non ségrégée **(e)** La SI dynamique ou kinapse. Figure extraite de Friedl et al., 2005.

### i) La SI stable ou monocentrique (Figurel.18.a)

Elle résulte d'une interaction entre un LT et une CPA polarisée, elle dure minimum 30min et est définie par le recrutement et la ségrégation de récepteurs et de protéines adaptatrices à la jonction intercellulaire. Cette structure permet une transmission de signaux intracellulaires soutenue dans le temps.

La formation d'une SI stable comprend 5 étapes(Bromley et al., 2001) :

1. le « scanning » cellulaire, le contact et l'arrêt de la cellule : le TCR est spécifique du complexe CMHp, ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1) se lie à LFA1 conduisant à l'arrêt transitoire de la migration, c'est le signal stop (Dustin et al., 1997)

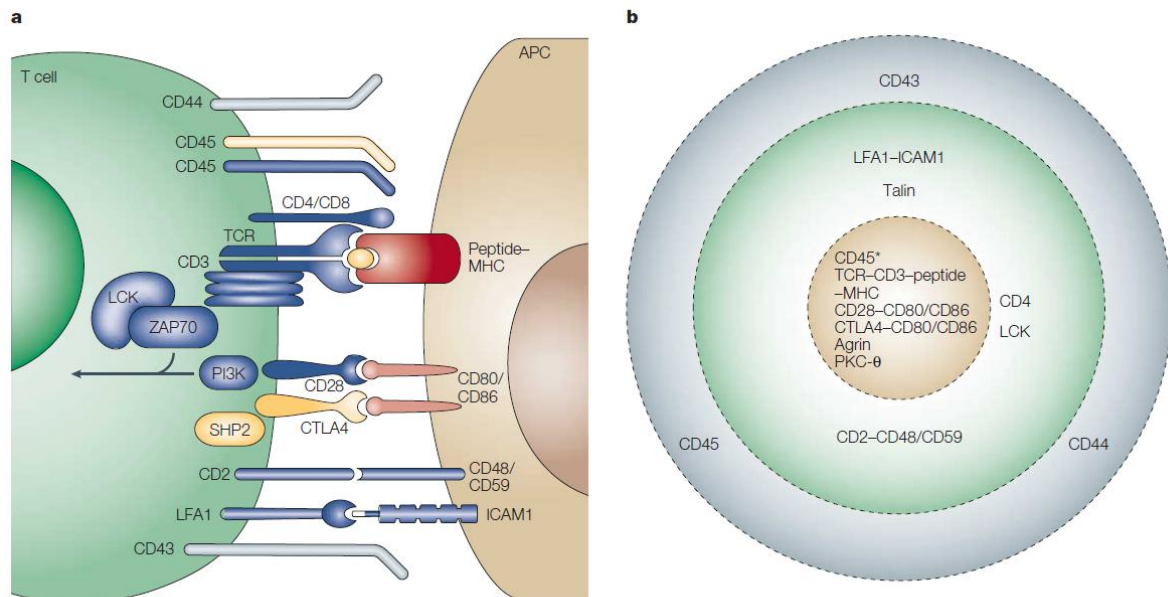
2. l'assemblage d'une SI et une signalisation précoce (Lee, 2002) : durant les premières secondes de contact une signalisation calcique est détectée (Friedmann et al., 2019; Gunzer et al.; Negulescu et al., 1996) suivie par l'activation et le recrutement de molécules de signalisation telles que CD3 $\zeta$ , LCK, ZAP70 et PI3K

3. l'agrégation des récepteurs : c'est la caractéristique de la formation d'une synapse mature (Bromley et al., 2001; Lee, 2002). Elle est définie par des zones appelées SMAC (supra molecular activation cluster) (Monks et al., 1998) (**Figure I. 19**). La zone centrale cSMAC (central SMAC) contient le TCR et la molécule CD3. D'autres molécules telles que CD28 (Andres et al., 2004), CD2 (Dustin et al., 1998), CD4 (Dustin et al., 1998), CD45 (Freiberg et al., 2002) et CTLA4 (Egen and Allison, 2002) sont également recrutées au moins temporairement. La zone cSMAC est entourée par une zone contenant LFA1 et taline (protéine de liaison à l'actine), appelée pSMAC (peripheral SMAC). Enfin, une 3<sup>ème</sup> zone plus distale a été définie, dSMAC (distal SMAC), riche en molécules fortement glycosylées telle que CD45 (Monks et al., 1998 ; Leupin et al. 2000).

4. l'internalisation du TCR : le TCR est internalisé dans des vésicules cytoplasmiques limitant sa disponibilité dans la zone de contact. Cette étape est importante puisqu'elle contribue à réduire l'intensité du signal et ainsi amorcer la dernière étape de dissociation de la SI (Lee et al., 2003).

5. la dissociation de la SI : les mécanismes de dissociation de la SI ne sont pas clairement établis, notamment si l'arrêt d'une SI est le prérequis ou la conséquence de la séparation des 2 cellules. Plusieurs mécanismes ont été proposés : (i) la diminution de l'expression du TCR lié à son activation (Lee et al., 2003; Liu et al., 2000) et des molécules d'adhésion telle que LFA1 (ii) l'augmentation de l'expression en surface et le recrutement à la synapse de

récepteurs de « contre-signalisation » tel que CTLA4 (Egen and Allison, 2002) (iii) l'induction de l'expression de chimiokines ou de récepteurs aux chimiokines initiant la motilité des LT (Ebert and McColl, 2002).



**Figure I. 19 : La SI mature. (a)** Vue de profil des ligands clés et molécules de signalisation impliqués dans la reconnaissance des LT-CPA. **(b)** Vue de face de la SI caractérisée par sa structure « bulls-eye » qui comprend la zone cSMAC en jaune, la zone pSMAC en vert et la zone dSMAC en gris. Les principales molécules impliquées dans la formation de la SI mature sont représentées dans les zones correspondantes. Figure extraite de Huppa and Davis, 2003.

La « SI mature ou monocentrique » fut la première caractérisée. On parle ainsi souvent de « SI » pour parler de « SI mature ou monocentrique » or comme détaillé ci-après, il existe d'autres type de contact. Mais la confusion peut s'expliquer par 2 choses : d'une part, si une SI mature se forme, d'autres structures plus instables peuvent la précéder et des informations peuvent déjà être échangées par les 2 cellules ; d'autre part, une structure concentrique est plus rare à observer comparé à des structures dites multifocales avec plusieurs agrégats de TCR qui présentent des similitudes avec la SI monocentrique (Thauland and Parker, 2010; Trautmann and Valitutti, 2003).

## ii) La SI sécrétrice ou effectrice (Figure I.18.b)

Elle est formée par les CTL, Th et cellules NK. Elle est similaire à la SI dite stable mais adaptée à la sécrétion de facteurs solubles dans l'aire synaptique. La zone cSMAC est divisée en deux pour créer une zone de sécrétion des granules. Dans le cas des LT CD8<sup>+</sup>, une partie du cSMAC

contient les molécules CD8, LCK, PKC-, LAT et AKT. Tandis que la taline et LFA1 sont localisés dans le pSMAC pour former la zone des molécules d'adhésion (O'Keefe et al., 2004; Stinchcombe et al., 2001a). La zone de sécrétion du cSMAC contient le centre organisateur des microtubules (MTOC) et les granules portant les protéines lytiques (perforine et granzymes) (Bossi et al., 2002; Kuhn and Poenie, 2002; Stinchcombe et al., 2001a). Cette zone est dépourvue d'actine pour permettre la sécrétion des granules (Stinchcombe et al., 2001a). Pour les LTh, les granules localisés dans cette zone contiennent des cytokines telles que l'IL-2, IL-4, IL-5 et IFN- $\gamma$  qui seront sécrétées vers leur CPA (Kupfer et al., 1991; Maldonado et al., 2004). La SI sécrétrice permet ainsi une sécrétion polarisée vers une CPA ou une cellule cible.

Cependant, la définition d'une SI sécrétrice comme une SI mature caractérisée par sa structure spécialisée est relativement controversée. En effet, plusieurs équipes ont montré que la cytotoxicité induite par les CTL ne nécessite pas la formation d'une SI mature (Faroudi et al., 2003a; O'Keefe et al., 2004; Purbhoo et al., 2004). L'équipe de S.Valitutti a également démontré qu'un CTL en contact avec sa cellule cible est sensible à un seuil d'activation permettant la formation d'une synapse lytique ou stimulatrice. La synapse lytique est définie par la polarisation de la machinerie lytique après une faible ou forte stimulation du TCR. La synapse stimulatrice définie par la polarisation des molécules de surface et de signalisation caractéristiques de la formation d'une SI mature se met en place seulement après une forte stimulation antigénique nécessaire à la production de cytokines. La formation d'une SI sécrétrice par une même population clonale peut donc être variable en fonction de la stimulation (Faroudi et al., 2003b, 2003a).

### **iii) La SI partiellement ségrégée ou multicentrique (Figure I.18.c)**

Si pendant le contact entre les cellules, la signalisation est interrompue avant la formation du cSMAC et du pSMAC, une synapse « incomplètement mature » se forme. Cette synapse est caractérisée par la formation de plusieurs agrégats de complexes TCR/CD3 proche de LFA1. Ces clusters sont dynamiques et peuvent se dissocier et s'associer durant l'interaction. Il a été montré que ce type d'interaction ne doit pas être considéré comme un défaut de formation d'une SI mature, mais il semblerait qu'elle est un rôle physiologique notamment dans la maturation des thymocytes lors de la sélection négative (Richie et al.). Il a également été mis en évidence qu'un LT mature peut interagir avec une DC en formant une SI

multicentrique. Cette interaction suffit à observer une signalisation TCR mise en évidence par le recrutement de PKC- $\theta$ , la phosphorylation des tyrosines, l'influx de calcium, l'activation de ERK, l'activation de NFAT et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Blanchard et al., 2004; Zaru et al., 2002).

#### **iv) La SI non ségrégée (Figure I.18.d)**

On peut distinguer 4 types de SI non ségrégées : la SI non spécifique ; la SI transitoire ; le contact cytolytique caractérisé comme diffus ; et la SI qui se forme souvent entre un LT naïf et une DC.

La SI non spécifique se forme lorsqu'un LT rencontre une CPA qui ne présente pas l'Ag reconnu par le LT. Ce contact non spécifique peut suffire à déclencher un enrichissement de CD3, la phosphorylation de résidus de tyrosine et une signalisation calcique permettant une faible prolifération et une survie des cellules (Revy et al., 2001). In vivo, ce type d'interaction peut être observé dans les organes lymphoïdes secondaires entre un LT et une CPA (Miller et al., 2004; Revy et al., 2001). Ces données ont permis de suggérer que ce type de contact pourrait être essentiel au maintien du stock de LT naïfs dans l'organisme.

La SI transitoire est définie par une SI dite « diffuse » mais suffisante pour transmettre un signal alors que les SMAC ne sont pas formés (Lee, 2002). Ce type d'interaction peut être observé lors de l'attaque des CTL de cellules cibles qui présentent une faible concentration antigénique. Il n'y a pas ségrégation des molécules à la synapse mais il y a exocytose des vésicules et mort de la cellule cible (Bertrand et al., 2013; Faroudi et al., 2003a). Enfin il a été montré qu'un LT CD8<sup>+</sup> naïf peut être activé par une DC sans la formation d'une SI mature et que la formation d'une SI mature n'est pas toujours atteinte, la SI reste adhésive, légèrement mobile et dans une phase « non ségrégée » (Blanchard et al., 2004; O'Keefe et al., 2004; Thauland and Parker, 2010).

#### **v) La SI dynamique ou kinapse (Figure I.18.e)**

La SI dynamique se forme lorsque le contact TCR-CMHp n'aboutit pas à une adhésion ferme, l'état migratoire persiste mais suffit à induire la transduction du signal. Ce mode d'interaction a été observé in vitro et in vivo lorsque les LT scannent les DC dans des matrices de collagènes ou dans les organes lymphoïdes secondaires (Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004; Gunzer et al.). Ce type de contact entraîne la formation de jonctions

cellulaires où les complexes moléculaires s'associent et se dissocient conduisant à une accumulation de composants de signalisation au niveau des TCR stimulés, pouvant résulter à un engagement du TCR en série (modèle détaillé précédemment partie I.1.b)(Friedl and Brouck, 2002; Valitutti et al. 1995)

Dans la littérature, en accord avec la description des SI dynamiques, la SI peut être divisée en 2 modes d'interaction : contacts dits statiques ou stables (synapses) ou des contacts migratoires (kinapses). Le terme kinapse désigne des interactions transitoires et relativement courtes. Plusieurs études ont mis en évidence ces structures, similaire à ce qu'on pourrait appeler des SI dynamiques (Dustin, 2008; Friedman et al., 2010; Moreau et al., 2012).

De ces observations découlent la discussion des modèles de contact d'un LT avec une CPA uniquement ou le modèle de rencontre d'un LT avec plusieurs CPA successives.

- Modèle de contact d'un LT et une CPA

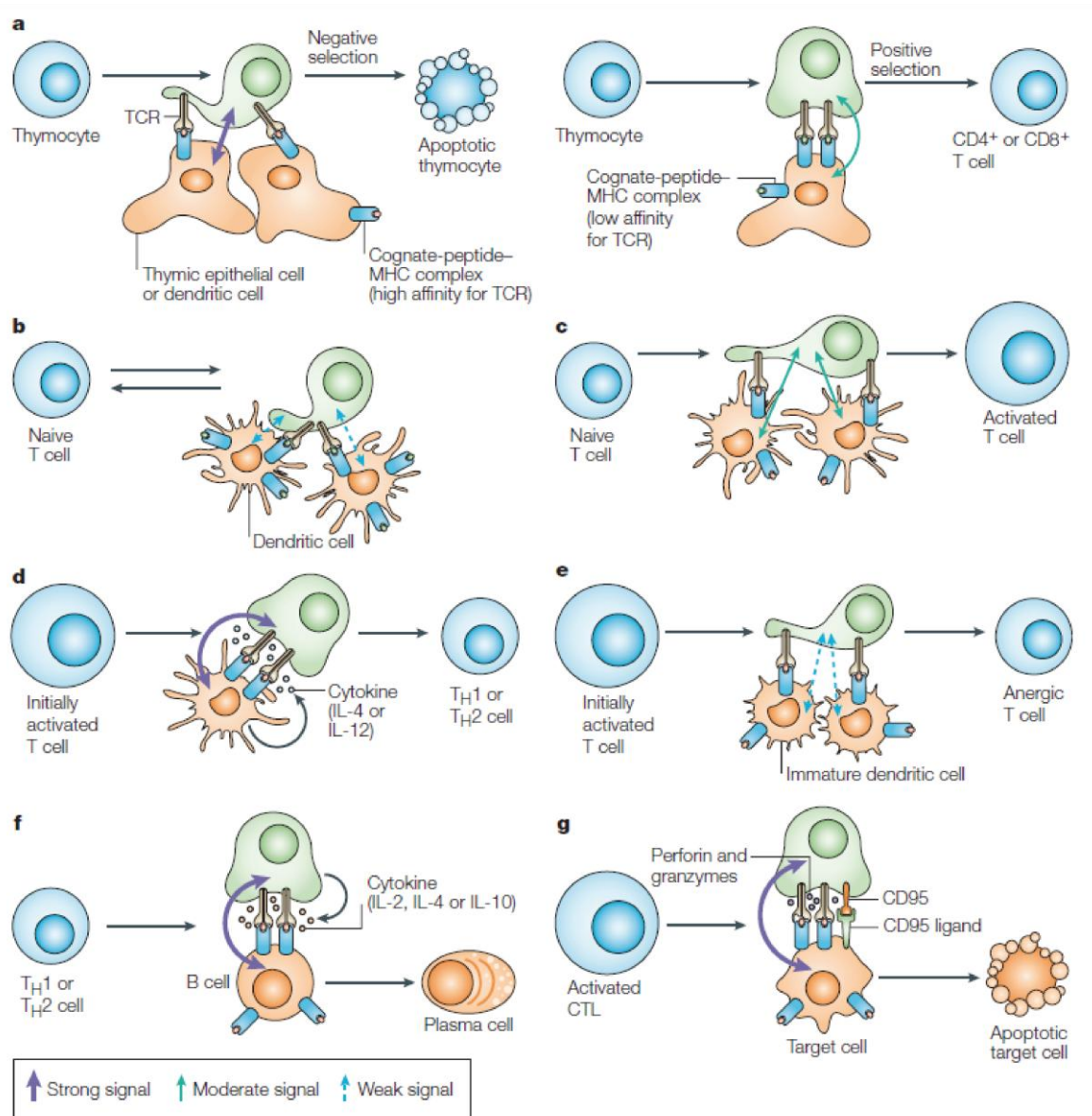
Ce modèle a émergé dans les années 1990 après les observations initiales des interactions LT-CPA. Dans cette configuration, l'engagement du TCR est décrit comme un signal stop conduisant à la stabilisation de la cellule par les molécules d'adhésion. Cette interaction forme une SI stable où le contact peut durer plusieurs heures(Dustin et al., 1997; Grakoui et al., 1999). C'est dans ce contexte que plusieurs études ont montré que des contacts prolongés entre LT-CPA sont important à l'activation complète des LT et à la stimulation de leur prolifération en fonction de la force du signal transmis par la CPA(Iezzi et al., 1998; Valitutti, 1995).

- Modèle d'interaction avec des CPA successives

P. Friedl et ses collaborateurs ont observé la mise en place de plusieurs interactions successives de 3 à 20 minutes formés par des LT mobiles et les DC dont ils sont spécifiques(Friedl et al., 2001; Friedl et al., 2005). Ces interactions sont courtes et séquentielles mais suffisent à induire une activation efficace des LT. L'intégration des signaux par des multiples contacts suggèrent l'existence d'une « mémoire à court terme » permettant au LT d'accumuler les signaux pendant quelques minutes. Cette capacité des LT à additionner les signaux a été confirmé par l'équipe de S.Valitutti (Faroudi et al., 2003b) et caractérisé *in vivo* par l'équipe de P.Bousso(Clark et al., 2011). La variabilité du devenir des



LT en fonction du type d'interactions et de sa localisation est résumé dans la **Figure 1.20** (Friedl et al., 2005).



**Figure 1.20 : Les différents modes d'interaction LT-CPA et la conséquence de ces interactions.** Les interactions des LT avec différentes CPA dans le thymus **(a)**, dans les organes lymphoïdes secondaires **(b-f)** et les tissus périphériques **(g)** conduit au développement des LT, leur maintien, leur activation, et leur fonction. Le devenir des LT dépend du contact et de l'intensité du signal. Des contacts de longue durée entraînent la formation d'interaction stable alors que les contacts de courte durée permettent aux LT d'interagir avec différentes CPA. **(a)** Différentes forces d'interaction CMHp-TCR détermine la stabilité et la dynamique d'interaction durant la sélection positive alors que pour la sélection négative les contacts sont stables. **(b)** Rencontre en série de plusieurs CPA par les LT permet de maintenir l'homéostasie des LT en absence de peptide agoniste. **(c)** Plusieurs rencontres en série permet l'activation initiale des LT naïfs par les complexes CMHp. **(d)** Pour l'activation initiale des LT, la stabilisation de contact permet la sécrétion de cytokines par les CPA et la maturation des LT en cellules effectrices. **(e)** L'engagement en série des LT qui

n'entraîne pas une interaction stable a été impliqué dans l'induction de la tolérance. **(f)** Les cellules Th forment des SI stable avec les LB et sécrètent des cytokines qui permettent la différenciation des LT en plasmocytes. **(g)** Les CTL forment des SI stable ou dynamique pour induire l'apoptose de cellules cibles par la sécrétion de molécules lytiques. Les LT qui ont reçu un signal sont représentés en vert.

### **I.1.e) Fonctions de la synapse immunologique : Activation et différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs en CTL**

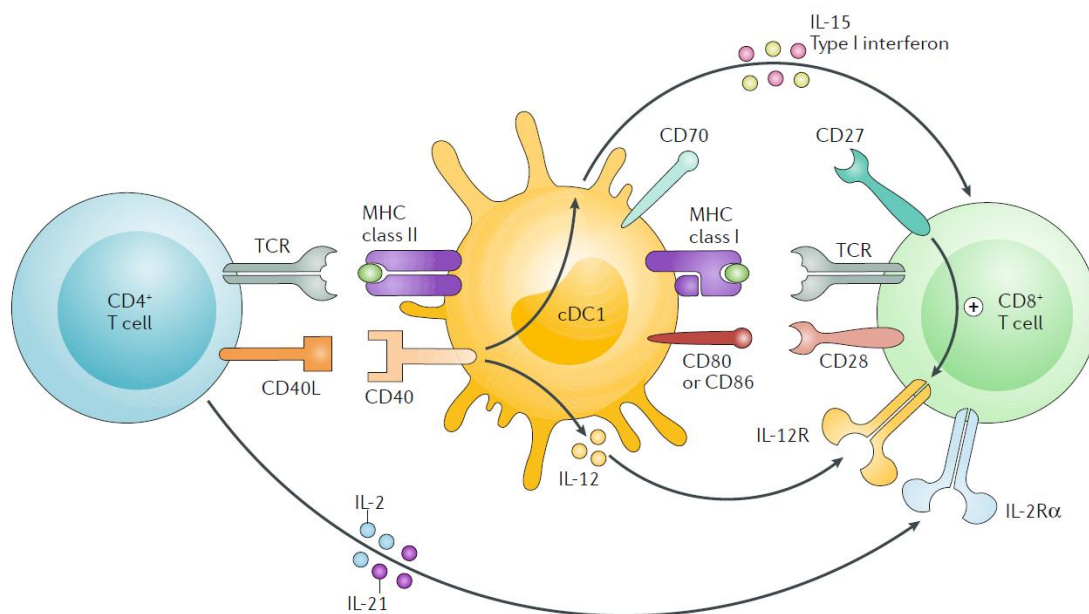
La première fonction attribuée à la SI est l'activation de LT naïfs en cellules effectrices. Dans cette partie nous décrirons brièvement uniquement les signaux nécessaires à l'activation et la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T cytotoxiques (CTL).

Les DC conventionnelles (cDC) activées migrent dans les organes lymphoïdes secondaires et activent les LT par 3 signaux (**Figure I.21**). Le premier signal est celui de l'interaction TCR-CMHp. Ce signal est celui déterminant la spécificité de la réponse immunitaire en cours. Le second est le signal de co-stimulation. Il n'est pas spécifique mais essentiel à l'activation des LT CD8<sup>+</sup>. En son absence, le LT CD8<sup>+</sup> entre en anergie ou meurt. Enfin, le 3<sup>ème</sup> signal provenant des cytokines inflammatoires va permettre d'induire une réponse productive car il conduit à la survie des LT CD8<sup>+</sup>, leur prolifération et la mise en place d'une réponse mémoire (Curtsinger and Mescher, 2010). Enfin, le LT CD8<sup>+</sup> reçoit également de « l'aide » des LTh activés par la DC (**Figure I.21**).

Une voie de signalisation clé dans ce dialogue entre les DC et les LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> est l'interaction CD40-CD40L. Les cDC augmentent leur expression de CD40 ligand (CD40L) suite à l'interaction avec les LT CD4<sup>+</sup>. Puis l'interaction CD40L-CD40 déclenche un signal dans la cDC1 qui augmente la présentation antigénique et l'expression de ligands de co-stimulation et des cytokines. L'IFN de type 1, l'IL-12, l'IL-15 sont produits par les Cdc1 qui agissent directement sur les LT CD8<sup>+</sup> pour permettre leur différenciation en CTL. Les cDC stimulés par CD40 expriment des hauts niveaux de CD80 et/ou CD86 et CD70 qui interagissent avec CD28 et CD27 respectivement sur les LT CD8<sup>+</sup>. La signalisation de CD27 est directement impliquée dans la différenciation, la survie et le métabolisme des LT CD8<sup>+</sup> ou indirectement par l'IL-12 produites par les DC et l'IL-2 produite de façon autocrine par les LT suite à l'augmentation de l'expression de leur récepteur à l'IL-12 et à l'IL-2, de l'IL-2. L'IL-2 et l'IL-21 produites par les LT CD4<sup>+</sup> peut aussi potentialiser les réponses des CTL.

Il est aujourd'hui décrit un modèle d'activation des LT CD8<sup>+</sup> en 2 étapes. Les cDC2 (DC conventionnelle de type 2) migratoires activées sur le site infectieux ou tumoral arrivent dans les ganglions lymphatiques ou dans la rate et activent des LT CD4<sup>+</sup> naïfs. En parallèle et de façon indépendante et dans des localisations différentes de l'organelymphoïde secondaire, les LT CD8<sup>+</sup> naïfs sont activés par les cDC1 (Bedoui et al., 2016; Calabro et al., 2016; Gerner et al., 2017). C'est dans une seconde étape que les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> interagissent avec la même cDC1 et c'est à cette étape que l'aide apportée par le LT CD4<sup>+</sup> se met en place (Eickhoff et al., 2015; Hor et al., 2015). Ce modèle montre donc qu'un LTh aide un LT CD8<sup>+</sup> préalablement activé et non complètement naïf.

Ces 2 phases d'activation font cependant toutes deux intervenir une SI, basée sur les 3 signaux précédemment décrits, essentielle à la transmission de l'information.



**Figure I.21 : Les 3 signaux d'activation d'un LT par une DC.** Signal 1 : interaction CMHp-TCR ; signal 2 molécules de co-stimulation ; signal 3 : cytokines. Figure extraite de Borst et al., 2018.

L'activation des LT naïfs déclenche l'expansion clonale d'une population de LT CD8<sup>+</sup> spécifique de l'agent pathogène ou des cellules transformées. Durant cette étape, les LT CD8<sup>+</sup> se différencient en CTL. Une fois que la cause de la stimulation du système immunitaire a été éliminée par les CTL, une phase de « contraction » est mise en place. Elle permet de contrôler ce nombre important de cellules qui a été généré (augmentation d'un facteur 1000 d'un clone LT). La majorité des LT CD8<sup>+</sup> meurent par apoptose et une petite fraction (environ 5-10%) survie pour donner une population de LT CD8<sup>+</sup> mémoires.

Ce processus n'est pas aléatoire, plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la génération d'une mémoire (Kaech and Cui, 2012). Le modèle basé sur la présence de cellules précurseurs initialement prédestinées à générer des cellules mémoires est appelé le modèle de « précurseurs séparés ». Ce modèle a été contesté par des équipes montrant qu'un LT naïf peut générer une cellule effectrice et une cellule mémoire (Gerlach et al., 2010; Stemberger et al., 2007). Cependant, ces travaux sont légèrement discutés car basés sur des LT CD8<sup>+</sup> avec un TCR transgénique, ils ne prennent donc pas en compte l'intensité du signal 1 (Kaech and Cui, 2012). Le modèle de « potentiel décroissant » basé sur l'accumulation plus ou moins importante de stimuli permettant de créer un large pool de cellules activées et ainsi plus ou moins différenciées (Ahmed and Gray, 1996). Le modèle de la « force du signal » basé sur la force du signal délivrée par les 3 signaux lors du priming du LT (Lanzavecchia and Sallusto, 2002). Enfin, le modèle de « division asymétrique » se rapproche du modèle dépendant de la force du signal, en fonction de l'intensité du signal un même clone pourrait se diviser pour donner une cellule effectrice et une cellule mémoire dès la première division (Chang et al., 2007).

Des cellules à longue durée de vie essentielles à la mise en place d'une réponse efficace et plus rapide lors d'une seconde rencontre avec le pathogène sont ainsi générées suite à la formation de SI LT-CPA.

De plus, bien que les LT au contraire des LB ne subissent pas une maturation d'affinité du TCR lors de la création de la population mémoire, certains résultats ont mis en évidence une augmentation de la sensibilité à l'antigène de LT mémoires par rapport aux LT naïfs. Cette modification serait basée sur des mécanismes d'avidité. Des cellules naïves comparées à des cellules mémoires ou effectrices avec le même TCR présentent des capacités différentes à lier l'antigène soluble (Fahmy et al., 2001; Cameron et al., 2001; Kao et al., 2005). Il a été proposé que l'assemblage du TCR en monomère ou hétérodimère ainsi que l'assemblage avec ses co-récepteurs modifieraient la signalisation induite dans le LT naïfs ou mémoires (Exley et al., 1995; Miguel et al., 1999; Schamel et al., 2005). Ces travaux révèlent ainsi la présence de microclusters de TCR capables d'induire une signalisation (notion détaillée ci-dessous).

### **Rôle de la SI mature**

Dans ce rôle final majeur qu'est la production d'un nombre important de cellules effectrices et la mise en place d'une mémoire immunologique, il est intéressant de souligner les

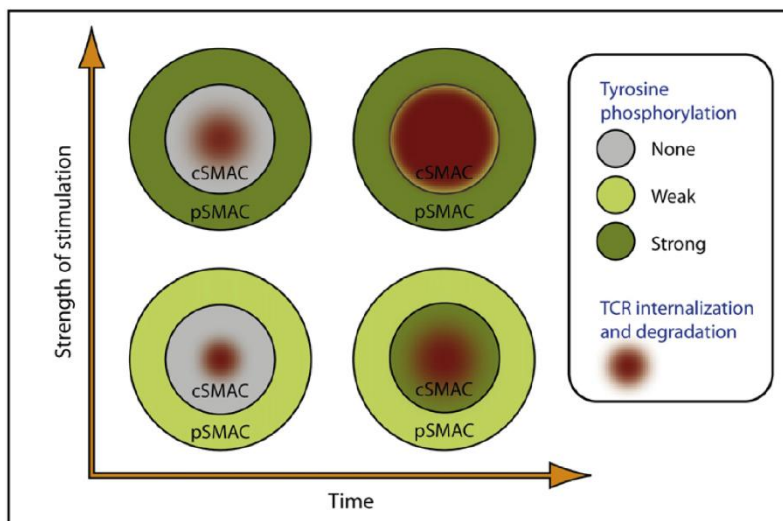
différents rôles de la mise en place ou non d'une synapse stable caractérisé par la formation du cSMAC :

- Initier la signalisation du LT

Les microclusters de TCR, composés d'un minimum de 11 à 17 molécules de TCR sont les plus petites unités de signalisation connues (Varma et al., 2006). De façon intéressante, plusieurs études ont suggéré que la formation de microclusters de TCR ne nécessite pas forcément une reconnaissance antigénique. En effet, des techniques de microscopie à haute résolution ont permis de détecter ces clusters en surface des LT effecteurs non stimulés (Lillemeier et al., 2010; Schamel et al., 2005; Sherman et al., 2011) et des LT naïfs (Crites et al., 2014). Ces agrégats de TCR varient très peu en terme de composition indépendamment de la stimulation antigénique. Ces résultats indiquent que des petites unités de signalisation préexistent dans les LT et sont en accord avec la description d'une signalisation qui démarre en périphérie de la synapse avant la ségrégation moléculaire. Ces données suggèrent que la ségrégation moléculaire permettant la formation des SMAC à la SI serait la conséquence plutôt que la cause de la signalisation du TCR.

- Contrôler la transmission du signal

Le modèle de la synapse stable (comme il a été détaillé dans ce chapitre) caractérisé par la formation du cSMAC nécessaire à la transmission d'un signal a longtemps été controversé. Récemment il a été proposé que le cSMAC permettrait de contrôler la signalisation du TCR en amplifiant des signaux de faible intensité et en atténuant des signaux de forte intensité (Čemerski et al., 2008). Čemerski *et al.* suggèrent que la signalisation du TCR et sa dégradation peuvent avoir lieu au niveau du cSMAC et que la balance entre les deux processus dépend de la force et de la qualité antigénique de stimulation (Čemerski et al., 2007, 2008; Valitutti, 2008) (**Figure I.22**).



**Figure I. 22: La signalisation du TCR peut avoir lieu au niveau du pSMAC et du cSMAC.** Après interaction LT-CPA, la signalisation (représentée par la phosphorylation des tyrosines, vert) démarre en périphérie de la SI à forte et faible concentration antigénique. Les TCR sont

internalisés et dégradés au centre de la SI (rouge). Avec une forte stimulation antigénique, la signalisation continue à travers la SI. La dégradation du TCR dans le cSMAC est importante, la phosphorylation des tyrosines n'est plus facilement détectée. A faible concentration antigénique, la signalisation via la phosphorylation des tyrosines est plus importante dans le cSMAC et la dégradation du TCR est modérée.

- Arrêter la signalisation

Afin d'étudier spécifiquement le rôle de la mise en place du cSMAC, Irvine *et al.* ont inséré une barrière physique dans les bicouches lipidiques afin de favoriser la formation de synapses multicentriques. Lorsque la formation du cSMAC est ainsi altérée, le TCR forme des « microclusters » associés à des patchs de tyrosines phosphorylées. Dans ces cellules, les auteurs ont pu montrer que la signalisation  $Ca^{2+}$  était significativement augmentée confirmant l'hypothèse que le cSMAC est impliqué dans l'inhibition de la signalisation du TCR (Irvine and Doh, 2007).

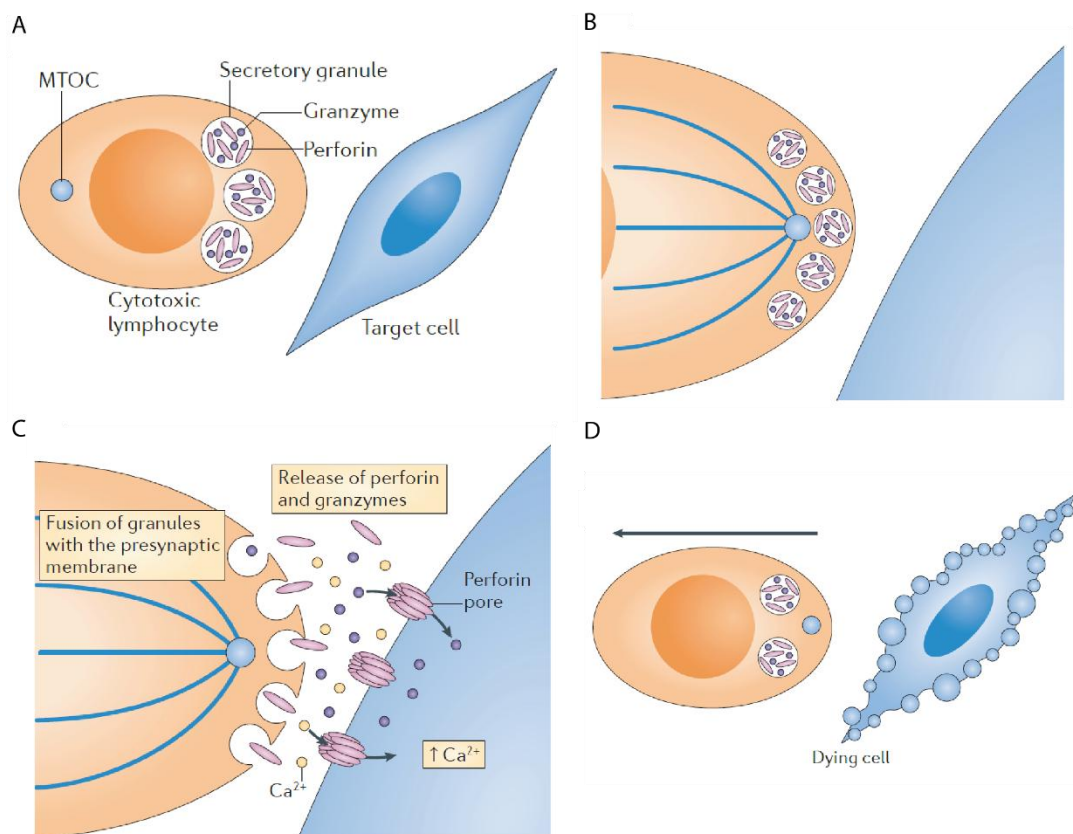
- Favoriser certains dialogues intracellulaires

Il a été proposé que la SI permettrait de créer une sorte de barrière physique afin de limiter la dispersion des molécules sécrétées (Dustin, 2010). De cette façon la SI privilégie des communications avec certaines cellules mais pas avec les cellules adjacentes. En accord avec ce principe, la formation du cSMAC entraîne un mouvement des filaments d'actine qui guide les molécules tels que le TCR et des molécules d'adhésion comme LFA-1 au centre de la synapse (Kaizuka *et al.*, 2007). Ce flux dynamique ainsi que les forces exercées (précédemment détaillées) pourraient favoriser l'entrée de molécules plus au centre de la synapse par rapport à la périphérie.

Concernant spécifiquement les CTL, la formation d'une synapse stable a été montrée comme augmentant leur efficacité lytique (protein kinase C regulates stability of the peripheral adhesion ring junction and contributes to the sensitivity of target cell lysis by CTL) en permettant l'induction d'une attaque ciblée (cytotoxicité induite par les CTL) directionnel en limitant la mort des cellules adjacentes (cellules cibles non spécifiques) (Beal *et al.*, 2008; Beal *et al.*, 2009).

## I.2. La synapse lytique CTL-cellule cible

Les LT CD8<sup>+</sup> activés dans les organes lymphoïdes secondaires migrent sur le site infecté ou tumoral. Durant cette étape toutes les molécules nécessaires à la fonction principale d'élimination de cellules cibles par le CTL sont synthétisées. Une fois chargés de ces molécules (**Figure I.23.A**), les CTL sont activés dans le tissu cible par la reconnaissance de complexes CMH I-peptide présentés par les cellules cibles. Ceci entraîne des cascades d'évènements moléculaires finement régulés (**Figure I.23.B et C**) permettant d'induire l'apoptose des cellules cibles (**Figure I.23.D**) via la formation d'une synapse dite lytique. La synapse lytique est une SI, ses caractéristiques d'interaction sont communes à celles préalablement détaillées dans le chapitre I.1. La synapse lytique se différencie par sa fonction finale qui est de tuer une cellule cible. Les différentes étapes permettant de parvenir à cette fonction sont détaillées dans ce chapitre.



**Figure I.23 : L'interaction d'un CTL avec une cellule cible. (A)** Le CTL reconnaît sa cellule cible et forme une SI. **(B)** Les granules lytiques sont ensuite polarisés indépendamment ou non du MTOC (centre organisateur des microtubules). Ils se regroupent à la membrane présynaptique. **(C)** Les granules lytiques fusionnent entraînant le relargage des molécules lytiques (perforine et granzymes). **(D)** La cellule cible entre en apoptose et le CTL peut reproduire ce phénomène avec d'autres cellules cibles.



## **I.2.a) Les granules lytiques : de leur biogénèse à leur exocytose**

### **Biogénèses des granules lytiques et production cytokines**

Au cours du processus de maturation des CTL, la perforine et les granzymes sont synthétisés et stockés dans des vésicules spécifiques des cellules cytotoxiques (CTL et cellules NK) appelées granules lytiques.

Les granules lytiques sont des organites spécialisés dans la sécrétion de molécules lytiques. Ils sont appelés « lysosomes sécrétoires » ou « organites apparentés aux lysosomes » (Blott and Griffiths, 2002; Peters, 1991). Des études de microscopie électronique ont montré que les protéines sécrétées par les granules lytiques (les molécules effectrices perforine et granzymes) sont localisées dans des corps denses associées à la sèrglycine typiques des organites apparentés aux lysosomes, et les protéines associées aux membranes, telles que LAMP1 et LAMP2, sont dans des corps multivésiculaires (**Figure I.24**).

La structure multivésiculaire des granules vient des invaginations progressives de la membrane des endosomes précoces. Dans les voies endolysosomales classiques, les endosomes précoces reçoivent des protéines provenant de la membrane plasmique et du golgi qui sont dirigées vers des endosomes tardifs et ensuite vers les lysosomes pour dégradation. La machinerie ESCRT et la protéine HRS reconnaissent les protéines ubiquitinylées à la surface des endosomes précoces qui subissent ensuite des invaginations pour former les corps multivésiculaires (Bache et al., 2003).

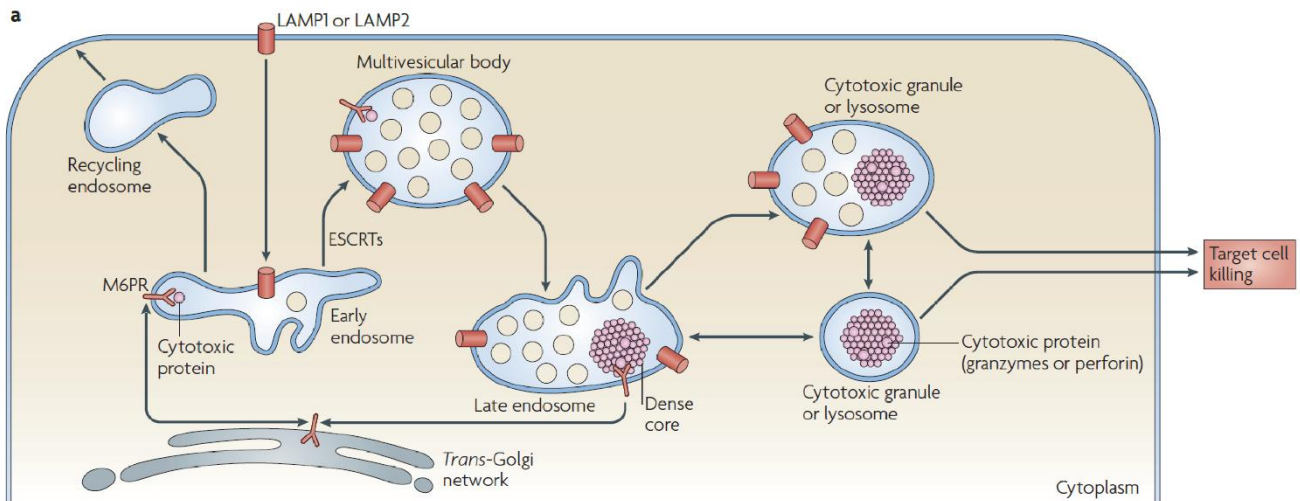
Durant leur biosynthèse, les granzymes sont modifiées par l'ajout d'un mannose-6-phosphate permettant leur transport vers les endosomes par le récepteur au mannose-6-phosphate (M6PR). Dans les endosomes tardifs, le pH acide entraîne la dissociation de M6PR de ses ligands qui retourne dans le réseau trans golgien (Griffiths and Isaaz, 1993) (**Figure I.23**). Le récepteur M6PR permet aussi de rediriger vers les corps multivésiculaires d'autres types de protéines telles que les hydrolases acides.

Après la production, il est intéressant de se demander comment une cellule tueuse exprime et stocke une grande quantité de protéine toxiques dans ses granules. Il a été montré que l'activité de la perforine est dépendante du pH et du  $\text{Ca}^{2+}$ . La perforine est active à pH neutre de la synapse immunologique mais inactive en conditions acides (Praper et al., 2010; Young, 1987). Les granules cytotoxiques des CTL étant à pH 5 sont ainsi un compartiment adéquat



au stockage de la perforine. Mais comment la perforine est dirigée du RE (environnement riche en  $\text{Ca}^{2+}$  et de pH neutre) vers les granules lytiques. Une hypothèse est que la perforine est synthétisée comme un précurseur inactif, avec un peptide inhibiteur en position carboxyterminal qui bloque le domaine C2 de liaison au calcium (Uellner, 1997). Mais ceci ne corrèle pas avec le fait que la perforine recombinante avec un domaine C-terminal intacte a la même activité et stabilité que la perforine sans ce domaine (Brennan et al., 2011). De plus, la structure détectée par cristallographie aux rayons X des monomères de perforine ont montré que le domaine C-terminal est loin des régions de liaison du calcium des domaines C2 (Law et al., 2010). Il a été suggéré dans ce papier au contraire que la région distale C-terminale code pour un motif d'export du RE nécessaire au transport du RE vers les granules. Une altération du domaine C-terminale résulte en une rétention de perforine stable et fonctionnelle dans le RE conduisant à la mort du CTL. Une explication de la survie de la cellule durant la synthèse de perforine serait donc qu'elle est rapidement exportée du RE, permettant une concentration de perforine active minimale dans le RE à un instant donné. Les protéines de transport exactes de la perforine sont toujours inconnues. Ce processus semble cependant impliqué dans mécanismes de trafic intracellulaire constitutif tel que LAMP1 (Krzewski et al., 2013). Le peptide en C-terminal est bien enlevé mais la fonction précise de ce mécanisme reste à élucider.

D'autres protéines membranaires telles que les protéines associées aux lysosomes (LAMPs) dont les fonctions sont mal connues sont dirigées vers les lysosomes via un motif tyrosine ou dileucine qui interagit directement avec des complexes de protéines adaptatrices (AP) (Feng et al.). Il a été suggéré que LAMP1 serait impliqué dans le trafic de la perforine de l'appareil de Golgi vers les granules lytiques (Krzewski et al., 2013).



**Figure I.24 : Biogénèse des granules lytiques.** Les granzymes et d'autres protéines solubles notamment les hydrolases lysosomales sortent du réseau trans-golgien par le M6PR (mannose-6-phosphate receptor) et transportés vers les endosomes précoces avant leur redirection avec les endosomes tardifs. M6PR est ensuite redirigé par le réseau trans-golgien. LAMP1 et LAMP2 vont directement à la membrane plasmique où elles vont subir un recyclage par la voie endosomale. Le recrutement de la machinerie ESCRT et la formation et la formation de vésicules luminal se déroulent dans les endosomes tardifs. Les granules lytiques sont des organelles « hybrides » qui contiennent des composants des lysosomes et des endosomes tardifs. Figure extraite de De Saint Basile et al., 2010.

Etonnement, peu d'étude font le lien entre la morphologie, le transport des protéines, les stades de maturation et les fonctions des granules cytotoxiques. Ce sont surtout des travaux sur des maladies génétiques caractérisées par un défaut de biogénèse des granules lytiques qui ont permis d'en apprendre davantage sur ces mécanismes.

Le syndrome Chediak-Higashi (CHS) et le syndrome Hermansky-Pudlak de type 2 (HPS2) sont des maladies génétiques caractérisées par un défaut des CTL et cellules NK dont la cause est une altération de la formation des granules cytotoxiques (Huizing et al., 2000; McVey Ward et al., 2000; Spritz, 1998; Stinchcombe et al., 2000). Il est intéressant de souligner que ces 2 pathologies sont associées à une hypopigmentation due à des défauts de formation des mélanosomes. Ceci souligne le lien entre les « organites apparentés aux lysosomes » que sont les granules lytiques et les mélanosomes.

Les souris mutantes *beige* et *pearl* développent des défauts similaires aux pathologies CHS et HPS2 et se sont révélées être des modèles essentiels à l'étude de ces altérations génétiques et de fait, à l'étude de la biogénèse des granules lytiques.

Les patients atteints de CHS et les souris *beige* ont des mutations sur le gène codant pour LYST (Nagle et al., 1996 ; Barbosa et al., 1997). LYST est une protéine cytoplasmique qui

régule le transport des lysosomes. Deux partenaires de LYST, HRS et LIP5 sont des protéines associées à ESCRT suggérant que LYST participe également au transport des protéines endosomales vers les lysosomes (Shim et al., 2008; Tchernev et al., 2002). LYST pourrait également être impliquée dans la fusion ou fission des lysosomes via un de ses partenaires HRS qui interagit avec SNAP25 nécessaires à ces processus, notamment dans les cellules neuroendocrine (Kwong, 2000). Au-delà du défaut immunitaire, ces patients souffrent aussi du développement de maladies neurologiques progressives (Tardieu et al., 2005).

Les patients atteints du syndrome HPS2 ont une mutation du gène *AP3B1* qui code pour la chaîne  $\beta$  du complexe AP3 qui entraîne une dissociation de ce complexe (Enders et al., 2006). AP3 est nécessaire au transport du réseau trans-golgien vers les endosomes et lysosomes (Dell'Angelica, 1997). On retrouve un recyclage des protéines lysosomales telles que LAMP à la membrane plasmique plus important dans les CTL AP3 déficients due à un transport altéré de ces protéines des endosomes précoces vers les endosomes tardifs et les corps multivésiculaires (Enders et al., 2006). Ces CTL ont également des granules plus grands que les CTL provenant d'individus non mutés. La mobilité de ces granules le long des microtubules est altérée (Clark et al., 2003). Ces défauts entraînent une importante altération de la capacité cytotoxique de ces CTL.

LYST et AP3 sont donc des régulateurs positifs de l'activité cytotoxique des CTL. Il existe au contraire des régulateurs négatifs de cette fonction tel que EBAG9. EBAG9 contrôle le trafic endolysosomal du granzyme B et des hydrolases vers les granules. A l'opposé de LYST et AP3, une déficience de cette protéine crée des granules lytiques de plus petite taille et une augmentation de l'activité cytotoxique des CTL (Ruder et al, 2005).

L'analyse de l'ensemble de ces protéines suggère que l'activité cytotoxique des CTL est finement régulée par la biogénèse de leurs granules lytiques qui intègre des régulateurs positifs et négatifs à différentes étapes.

Il existe aussi des déficiences du contenu des granules lytiques. La déficience de perforine conduit à un certain type de HLH (Haemophagocytic lymphohistiocytosis) qui est la lymphohistocytose hémophagocytaire familiale de type 2 (FHL2). Chez ces patients les mutations sur le gène *PRF1* affectent la conformation ou le transport de la perforine vers les granules lytiques (Menasche et al., 2005; Stepp, 1999).

Concernant les granzymes, l'étude de souris déficiente en seryl-glycine, le protéoglycane retrouvé principalement dans les granules lytiques a permis de mettre en évidence son rôle

dans le stockage de granzyme B et la formation des corps denses des granules. Cependant, une étude suggère que la serglycine n'est pas essentielle au stockage de granzyme A et de la perforine et n'est pas requise pour l'activité cytotoxique des CTL (Grujic et al., 2005).

### **Polarisation de la machinerie lytique**

Les microtubules sont définis par une polarité positive et négative organisée par rapport au centre organisateur des microtubules (MTOC). Les extrémités négatives sont au niveau du centrosome et les extrémités positives vers l'extérieur. Après stimulation du TCR, le MTOC se polarise à la SI (Geiger et al., 1982). Le MTOC est associé avec l'appareil de Golgi, lieu de production des protéines (Kupfer et al., 1983). La réorientation du MTOC permet ainsi la réorientation d'organites impliqués dans la synthèse des facteurs lytiques et cytokiniques.

Les premières observations de polarisation du MTOC ont été faites dans le CTL. Ces données ont été couplées à l'observation de la cytotoxicité unidirectionnelle et spécifique induite par les CTL. Le groupe de G. Berke a ainsi suggéré que les 2 phénomènes étaient liés (Geiger et al., 1982). L'ensemble de ces travaux démarre une longue série de publications sur le phénomène de polarisation du MTOC dans les LT. Il a ainsi été montré que c'est un phénomène actif effectué par les CTL, les cellules NK (Kupfer and Dennert; Yannelli et al.) et les LT CD4<sup>+</sup> (Kupfer and Dennert).

L'une des caractéristiques majeures de la polarisation du MTOC est sa rapidité : il est polarisé dès les premières minutes de contact avec une cellule cible et avant même la formation d'une SI stable (Depoil et al., 2005; Huse et al., 2007). De plus, une étude a montré qu'une fois localisé à la SI, le MTOC n'est pas statique mais oscille sur une distance de 2 µm. Ces oscillations seraient générées par les forces rencontrées lors de la formation de la SI (Kuhn et al., 2002).

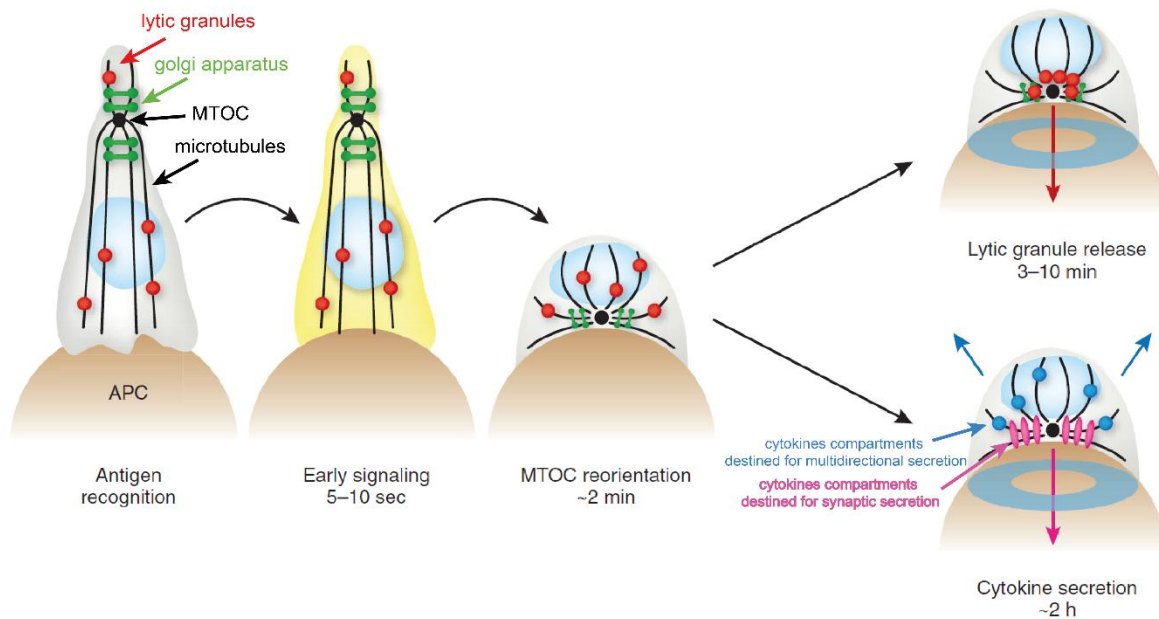
La polarisation du MTOC à la SI est donc admise mais sa nécessité absolue pour la sécrétion des granules lytiques est cependant controversée. En effet, il a été montré que des CTL traités au nocodazole (entraîne la dépolymérisation des microtubules) sont incapables de polariser leurs granules et la cytotoxicité induite par ces CTL en est fortement impactée. Les granules migrent vers l'extrémité négative des microtubules qui elle-même migrent vers le centre de la SI (Dustin and Long, 2010; Kupfer and Dennert; Lagrue et al., 2013; Stinchcombe et al., 2006). Selon ce modèle, le centrosome est donc nécessaire à l'induction

de cytotoxicité. Deux types de sécrétion des granules lytiques dépendant du MTOC ont été décrits : une voie rapide et une voie plus lente. Une forte signalisation antigénique induit un enrichissement rapide des granules au niveau du MTOC suivi par une rapide relocalisation du MTOC à la SI. Une signalisation antigénique plus faible induirait une polarisation du MTOC à la SI suivie par la migration des granules lytiques plus lente vers le MTOC(Beal et al., 2009). En effet il a été montré que la polarisation des granules lytiques et du centrosome peuvent être dissociées (Jenkins et al., 2009).

Cependant, ce modèle ne corrèle pas avec la capacité des CTL à tuer plusieurs cibles simultanément(Wiedemann et al., 2006; McGavern et al. 2002).

Tout d'abord, une étude a montré que le MTOC d'un LT CD8<sup>+</sup> en contact avec 2 cellules cibles oscille entre ces-dernières pour finalement induire leur mort(Kuhn and Poenie, 2002). De plus, l'équipe de S.Valitutti a montré que des granules lytiques peuvent être sécrétés indépendamment de la polarisation du MTOC. Par des approches de microscopie en TIRF et de vidéo microscopie, ils ont pu d'une part montrer que le MTOC et les granules lytiques étaient dissociés au niveau spatio-temporelle. D'autre part, l'exocytose des granules lytiques se déroule très rapidement après le contact avec les CTL et avant la polarisation du MTOC. De façon intéressante une altération de l'organisation des microtubules n'a pas d'impact sur l'efficacité de killing des CTL(Bertrand et al., 2013). Cette sécrétion indépendante du MTOC est compatible avec la capacité des LT CD4<sup>+</sup> à sécréter des cytokines dans plusieurs directions (Huse et al., 2006).

Par rapport au modèle initial de polarisation des granules lytiques MTOC dépendant présenté **Figure I.25**, l'équipe de S.Valitutti a montré que dès les premières phases de signalisation du TCR (illustré en jaune sur le schéma), des granules lytiques sont exposés à la synapse. Cette phase peut être suivie de la polarisation du MTOC mais il est tentant d'émettre l'hypothèse que dans le cas où une autre cellule cible serait présente, 2 phases de sécrétion des granules lytiques pourraient se mettre en place. Une sécrétion MTOC dépendante et une MTOC indépendante. Ceci justifiant alors la capacité des CTL à tuer plusieurs cibles simultanément(Wiedemann et al., 2006). Ces données soulignent d'autant plus l'efficacité et la rapidité fonctionnelle des CTL.



**Figure I.25 : Activation et cinétique de réponse des LT.** La reconnaissance antigénique déclenche une transduction du signal très rapide du TCR, traduit par une sécrétion des granules lytiques parallèle ou non à une réorientation du MTOC à la SI. La sécrétion des granules lytiques est très rapide alors que la sécrétion de cytokine prendra quelques heures. Figure adaptée de Huse et al., 2008.

De façon intéressante, Voskoboinik et al. suggèrent à partir de ces données qu'il existe donc une certaine plasticité des mécanismes de sécrétion des granules lytiques. Ceci expliquerait pourquoi les pathologies causées par des défauts du cytosquelette entraîne des altérations de la fonction cytotoxique variables (Voskoboinik et al., 2015).

### Sécrétion de la machinerie lytique (Figure I.26)

De la même façon que pour la biogénèse des granules lytiques, ce sont des pathologies regroupées dans les HLH qui ont permis d'identifier des acteurs moléculaires essentiels au « docking » des granules.

Le syndrome de Griscelli de type 2 (GS2) et la souris *ashen* sont caractérisés par un défaut d'activité cytotoxique des CTL et des cellules NK et également une hypopigmentation reflétant de nouveau les mécanismes partagés par les mélanosomes et les granules lytiques. Les mutations de cette pathologie affecte RAB27a, une petite GTPase de la famille Rab (Bahadoran et al., 2001; Ménasché et al., 2000; Wilson et al., 2000). Les CTL RAB27a déficients présentent un défaut d'exocytose des granules. Les granules lytiques sont

polarisés mais ne « s'accrochent » pas à la membrane plasmique de la cellule (Ménasché et al., 2000; Stinchcombe et al., 2001b).

SLP1 et SLP2 (synaptotagmin like protein 1 et 2) ont été identifiées comme des protéines cibles de RAB27a dans les CTL. Elles contiennent 2 domaines C2 qui sont des domaines qui peuvent s'associer aux phospholipides suggérant leur rôle dans l'ancrage de RAB27a à la membrane plasmique (Holt et al., 2008; Ménasché et al., 2008). Le rôle de RAB27a dans les CTL semble être majoritairement associé à la liaison des vésicules à la membrane, mais il est important de noter que la famille des Rab GTPases est essentielle au trafic vésiculaire et au transport de protéines. Des défauts de cette famille protéiques sont donc impliqués dans plusieurs troubles immunitaires (Krzewski and Cullinane, 2013).

Une étape d'ancrage des vésicules à la membrane plasmique avant la fusion est ensuite mise en place. De nouveau c'est une forme de HLH, la FHL3 caractérisée par l'absence de MUNC13-4 et le modèle murin *jinx* qui ont permis la mise en évidence des acteurs moléculaires impliqués dans cette étape. Cette pathologie entraîne un phénotype similaire à la déficience en perforine (Crozat et al., 2007; Feldmann et al., 2003). Comme la déficience de RAB27a, les granules lytiques sont polarisés mais ne sont pas exocytés et la voie de sécrétion des cytokines telle que l'IFN $\gamma$  n'est pas affectée (Feldmann et al., 2003). MUNC13-4, semble ainsi réguler l'interaction entre les SNARE en les maintenant dans une conformation ouverte. Ces protéines SNARE sont nécessaires à l'étape suivante de fusion du granule avec la membrane plasmique détaillée ci-après.

Ménager *et al.* suggèrent l'existence de 2 types de vésicules : les granules lytiques et des vésicules d'exocytose endosomales qui apporteraient les acteurs moléculaires d'exocytose nécessaires à la dégranulation des granules lytiques. En effet, il a été montré que RAB27a n'est pas constitutivement associé aux granules lytiques des CTL mais est recruté en réponse à une stimulation TCR. Rab27a-GFP surexprimé dans les CTL colocalise avec la perforine seulement juste avant la dégranulation (Ménager et al., 2007). Il en est de même pour MUNC13-4 qui a été retrouvé dans un pool de vésicules endosomales qui porte la machinerie d'exocytose, se polarisent simultanément avec des granules contenant la perforine (Ménager et al., 2007; Wood et al., 2009).

La dernière étape est la fusion des granules lytiques avec la membrane plasmique. Cette étape fait intervenir des protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor

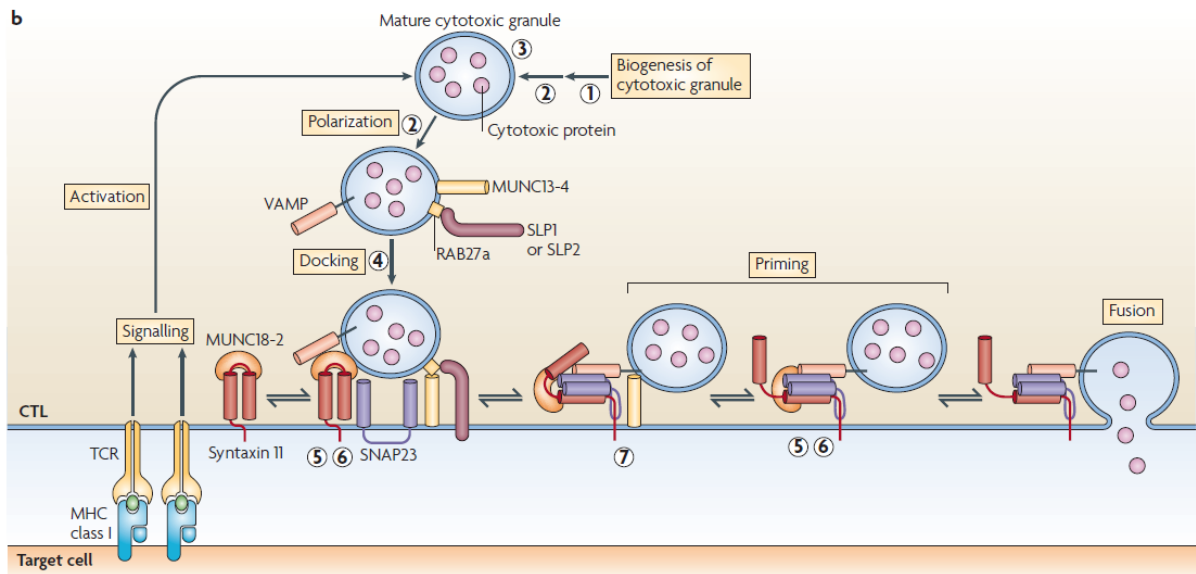
accessory protein receptors). Ces protéines sont impliquées dans le trafic vésiculaire des cellules eucaryotes et ont été fortement conservées au cours de l'évolution. Lors de la formation d'un complexe SNARE, les liaisons des partenaires moléculaires entre eux sont spécifiques permettant de former des complexes eux-mêmes très spécifiques de différentes étapes dans la fusion des vésicules. Les différentes protéines SNARE ont aussi différentes localisations ajoutant un degré de spécificité et leurs interactions sont régulées par un grand nombre d'autres protéines (Bonifacino and Glick, 2004; Chen and Scheller, 2001; Weber et al., 1998). Les SNARE ont été initialement catégorisées en 2 groupes, les v-SNARE pour SNARE vésiculaires et les t-SNARE pour target en anglais, soit les membranes cibles.

La syntaxin 11 est une t-SNARE dont le défaut cause la FHL4, une forme de HLH. Comme décrit précédemment cette déficience entraîne un défaut d'exocytose des granules lytiques mais pas de leur polarisation (zur Stadt, 2005). Ce défaut peut être partiellement restauré par une stimulation à l'IL-2 suggérant que l'activation cellulaire induit la production de protéines qui peuvent compléter la perte de la syntaxine 11 ou l'utilisation d'une voie de sécrétion syntaxine 11 indépendante (Bryceson et al., 2007).

L'interaction des protéines SNARE nécessitent une protéine accessoire, MUNC18-2. Des mutations du gène codant pour cette protéine nommé *STXBP2* entraîne une HLH nommé FHL5 (Côte et al., 2009; zur Stadt et al., 2009). MUNC18-2 interagit avec la syntaxine 11 dans les CTL. Ce complexe permet l'ancrage et la fusion des granules lytiques à la membrane plasmique.

Pour permettre la libération efficace du contenu des granules, la sphingomyélinase acide (ASMase) a été suggérée comme impliquée dans le mouvement des lipides membranaires et la contraction des granules. Les souris déficientes pour cette protéine présentent une réduction de la cytotoxicité dépendante des granules (Herz et al., 2009).





**Figure I.26 : Exocytose des granules lytiques.** Suite à l'engagement du TCR les granules lytiques sont polarisés à la SI. Les filaments d'actine sont écartés du site de sécrétion. Les granules lytiques se lient à la membrane plasmique par l'interaction de RAB27a avec SLP1 (synaptotagmin like protein1) ou SLP2. Les granules lytiques interagissent également avec le complexe MUNC18-2 et la syntaxine 11. Les granules lytiques sont ensuite dirigés par MUNC13-4 qui permet d'ouvrir la conformation de la syntaxine 11. Deux complexes SNARE se forment entre les SNARE membranaire telles que VAMP7 et/ou VAMP8 et la syntaxine 11 avec SNAP23 permettant la fusion de la vésicule via MUNC18-2. Les numéros indiquent les étapes altérées par les pertes de fonctions à l'origine des lymphohistocytose haemophagocytaire : (1) LYST, (2) AP3, (3) perforine, (4) Rab27a, (5) syntaxine 11, (6) MUNC18-2 et (7) MUNC13-4. Figure extraite de Saint Basile et al., 2010.

### La famille des protéines VAMP

La famille de protéines associées aux vésicules (VAMP) est impliquée dans la fusion des vésicules grâce à l'interaction avec des complexes SNARE (**Figure I.26**). VAMP2 colocalise avec les granules lytiques et les souris VAMP2 déficientes présentent un défaut d'exocytose des granules lytiques. VAMP4 et VAMP7 colocalisent également avec les granules lytiques et leur diminution de l'expression par siARN entraîne un défaut de cytotoxicité perforine dépendante. De plus, chez la souris, VAMP8, une v-SNARE est associée à l'exocytose de vésicules sécrétrices dans plusieurs types de cellules immunitaires, colocalise avec granzyme B. Les CTL *Vamp8* déficients présentent un défaut d'exocytose des granules et un pouvoir cytotoxique altéré. Une étude de SIM (structured illumination microscopy) et de microscopie TIRF a montré que VAMP8 est majoritairement associé au recyclage des compartiments endosomaux par rapport aux granules lytiques. De plus, les auteurs ont montré une accumulation rapide et une fusion des endosomes recyclés à la SI avant l'arrivée des

granules lytiques. L'inhibition de l'expression de VAMP8 altère le recyclage des endosomes et la fusion des granules lytiques, révélant l'étape de fusion VAMP8 dépendante entre le recyclage des endosomes et la membrane plasmique qui apporte Stx11 près de la SI pour l'exocytose des granules lytiques.

Plusieurs études ont démontré le rôle des protéines SNARE dans le mécanisme de sécrétion des granules lytiques par fusion à la SI. Cependant, les protéines lytiques telles que la perforine, les granzymes A et B et Fas-L dont l'expression peut être induite après engagement du TCR peuvent aussi être sécrétées directement de l'appareil de golgi à la SI (Isaaz et al., 1995; Makedonas et al., 2009).

Deux études ont identifié la nécessité des PKC pour la polarisation et l'exocytose des granules lytiques. Les CTL PKC déficient murins ont un défaut dans ces 2 processus malgré une polarisation correcte du MTOC. Ce défaut de polarisation des granules lytiques entraîne une perte de l'activité cytotoxique des CTL. L'activité kinase de la PKC est donc impliquée dans les premières étapes d'exposition des granules lytiques (Ma et al., 2007, 2008).

### **I.2.b) Fonctions effectrices des CTL**

Les CTL utilisent 2 voies de lyse des cellules cibles, une voie perforine-granzyme dépendante et une voie dépendante des récepteurs de mort (voie Fas/FasL). Des déficiences héréditaires des deux voies cytotoxiques ont été décrites chez l'Homme. Des défauts de l'une ou l'autre de ces voies sont associées à une dérégulation de l'homéostasie lymphocytaire.

L'absence de FAS ou de FASL chez l'Homme, ainsi que les modèle murins *lpr* et *lprg* (absence de FAS) ou les souris *gld* (absence de FASL) développent un syndrome lymphoprolifératif avec accumulation de LT et LB non malignes, et une auto-immunité (Rieux-Laucat et al., 2003).

Chez l'Homme, les anomalies de la fonction cytotoxique des LT et cellules NK par la voie perforine-granzyme dépendante entraînent de graves déficiences immunitaires souvent mortelle comme la lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH) (déjà abordé dans la partie

décrivant la biogénèse des granules lytiques) (Ménasché et al., 2005; de Saint Basile and Fischer, 2001).

### **Mort de la cellule cible contact dépendante**

#### **- Voie perforine-granzymes dépendante**

Les granules lytiques sont dirigés vers la synapse immunologique où perforine, granzymes et granulysine sont sécrétés.

Historiquement, la première découverte que les lymphocytes tuent des cibles spécifiques a été faite dans les années 1960. Puis, les mécanismes utilisés ont été mis en évidence. Les granules ont été montrés comme polarisés vers la cellule cible et le mouvement des granules lytiques à la synapse immunologique a été mis en évidence (Bykovskaja et al., 1978). Une protéine monomérique de 67kDa capable de former des pores a ensuite été isolé, la perforine (Henkart, 1984; Podack et al., 1985). Durant la même période, plusieurs granzymes ont été découverts comme des constituants important des granules lytiques (Masson et al., 1987; Jenne et al., 1988; Young et al., 1986), puis ont été montré plus tard comme inducteurs d'apoptose dans les cellules cibles (Shi, 1992; Shi et al., 1997). La toxine granulysine et sa fonction perturbatrice des lipides a été découverte durant ces mêmes années (Jongstra et al., 1987).

Les caractéristiques et fonctions de ces protéines, seront détaillées dans ce chapitre ainsi que les modèles connus d'induction de mort dans les cellules cibles, particulièrement intéressant dans mon projet de thèse.

#### **La perforine :**

Les groupes d'Henkart puis Okumura et Podack ont isolé une protéine monomérique de 67kDa, la perforine, capable de s'oligomériser à pH neutre et en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  pour former des pores (Henkart, 1984; Podack et al., 1985) (**Figure I.27**). Un des éléments qui a permis de comprendre la fonction de cette protéine est la mise en évidence, par une approche de microscopie électronique, de similitudes entre la perforine et le complexe d'attaque membranaire du complément.

L'activité de formation de pores par la perforine permet aux granzymes pro-apoptotiques d'accéder au cytoplasme de la cellule cible où ils clivent leur substrat pour initier l'apoptose de celle-ci (Voskoboinik et al., 2006).

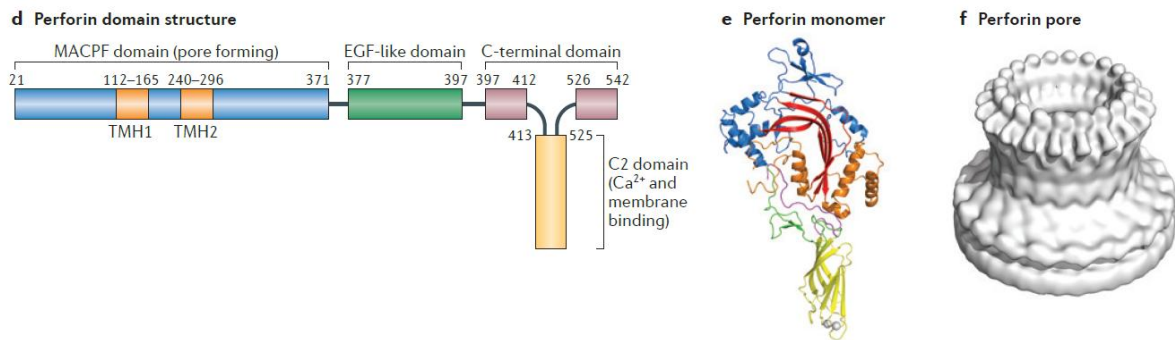
Des études chez la souris ont montré que le KO de la perforine bloque la mort dépendante des granules. Ces données soulignent le rôle de la perforine comme une protéine clé et non redondante dans l'induction de l'apoptose par les granzymes (Bolitho et al., 2007; Voskoboinik et al., 2006).

La transcription de la perforine est induite suite à une activation antigénique ou cytokinique des LT CD8<sup>+</sup> naïfs en CTL (processus détaillé préalablement partie I.1.e). Durant cette différenciation le facteur de transcription RUNX3 va permettre l'expression du gène *PRF1*. RUNX3 induit également l'expression d'un autre régulateur transcriptionnel de *PRF1*, l'eomesodermin (*EOMES*) (Cruz-Guilloty et al., 2009; Pipkin et al., 2010).

Des études ont également montré une régulation post-transcriptionnelle de *PRF1*. Des microARN (miARN) peuvent se lier à l'extrémité 3' de *Prf1* diminuant ainsi son expression. D'autres miARN agissent indirectement en diminuant l'expression d'EOMES. En fonction du mode d'activation, plusieurs miARN peuvent diminuer la traduction de *Prf1* dans les CTL: miR-27a (Kim et al., 2011), miR-139 et miR-342 (Trifari et al., 2013). D'autres miRNA ont été montrés comme impliqués dans la régulation de l'expression de la perforine dans les cellules NK tel que miR-150 (Kim et al., 2014).

Moduler l'expression de la perforine avec les miARN s'est avéré intéressant puisque le transfert adoptif de cellules NK déficientes pour l'expression de miR-150 donc qui surexpriment la perforine, entraîne un meilleur rejet tumoral que les cellules contrôles. De plus, des cellules NK surexprimant miR-27a sont moins efficaces que les cellules contrôles. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de ces miRNA dans la régulation de l'expression des molécules effectrices de CTL provenant de contextes tumoraux ou inflammatoires.

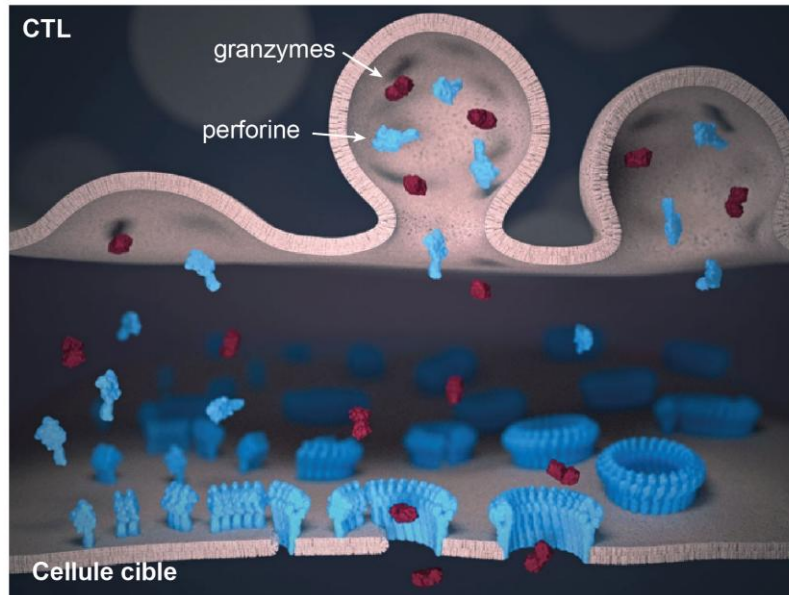
La perforine produite est stockée dans les granules lytiques comme discuté dans le chapitre traitant la biogénèse des granules lytiques.



**Figure I.27 : Structure de la perforine**

Des études de cristallographie aux rayons X ont permis de montrer que le domaine formant un pore, appelé le domaine du « complexe d'attaque membranaire et domaine perforine » (MACPF) présente des homologies avec les cytolysines cholestérol dépendante (CDC) bactériennes (2007 MAHadders, 2007 CJRosado). Ces domaines se lient et s'oligomérisent à la surface membranaire pour former un pré-pore qui pourra ensuite s'agrandir. Après l'assemblage du pré-pore, les régions transmembranaires en hélice 1 et 2 (TMH1 et TMH2) de chaque monomère s'insère dans la membrane (Shatursky et al.; Tilley et al., 2005).

Via un mécanisme similaire, il a été montré que la perforine est capable de former des pores incomplets qui peuvent pénétrer et endommager les membranes (Metkar et al., 2015). Récemment B.Hoogenboom et ses collaborateurs ont pu visualiser en temps réel la formation de pore par la perforine par une combinaison d'approches de microscopie à force atomique et de microscopie électronique (Leung et al., 2017). Ils ont mis en évidence que l'assemblage du pore passe par une étape intermédiaire de pré-pores irréversibles qui après insertion dans la membrane recrutent d'autres oligomères (pré-pores) permettant d'agrandir cette structure. On retrouve alors la formation d'« arc » de perforine dans la membrane. Ces travaux sont intéressants car ils apportent une explication structurale sur l'efficacité et la rapidité connue des CTL à perforer leur cellule cible qui passerait par cet état d'intermédiaires « d'arcs de perforine » déjà capables d'endommager les membranes (Caramalho et al., 2009; Wiedemann et al., 2006) (**Figure I.28**).



**Figure I.28 : Formation de pores par la perforine à la SI**

<https://www.ucl.ac.uk/news/2017/feb/immune-system-defence-force-captured-action>

#### **Les granzymes :**

A l'inverse de la perforine, la délétion d'un seul gène codant pour une granzyme a permis de montrer des redondances fonctionnelles (Simon et al., 1997). Le syndrome Papillon-Lefèvre (associé à une déficience en cathepsin C) a été proposé comme la cause d'un défaut d'activité des granzymes car toutes les pro-granzymes nécessitent la cathepsin C pour une dernière étape de maturation pour donner les granzymes (Pham and Ley, 1999; Pham et al., 2004).

En effet, trois sous familles de granzymes avec des spécificités variables sont exprimées par les CTL humains (Kaiserman et al., 2006). Les granzymes sont des sérines protéases connues pour plusieurs fonctions : activer la voie des caspases ; Shi et al., 1992), réguler l'inflammation (Hiebert and Granville, 2012) et interférer avec des voies de signalisation virale permettant d'éliminer l'infection (Andrade et al., 2007).

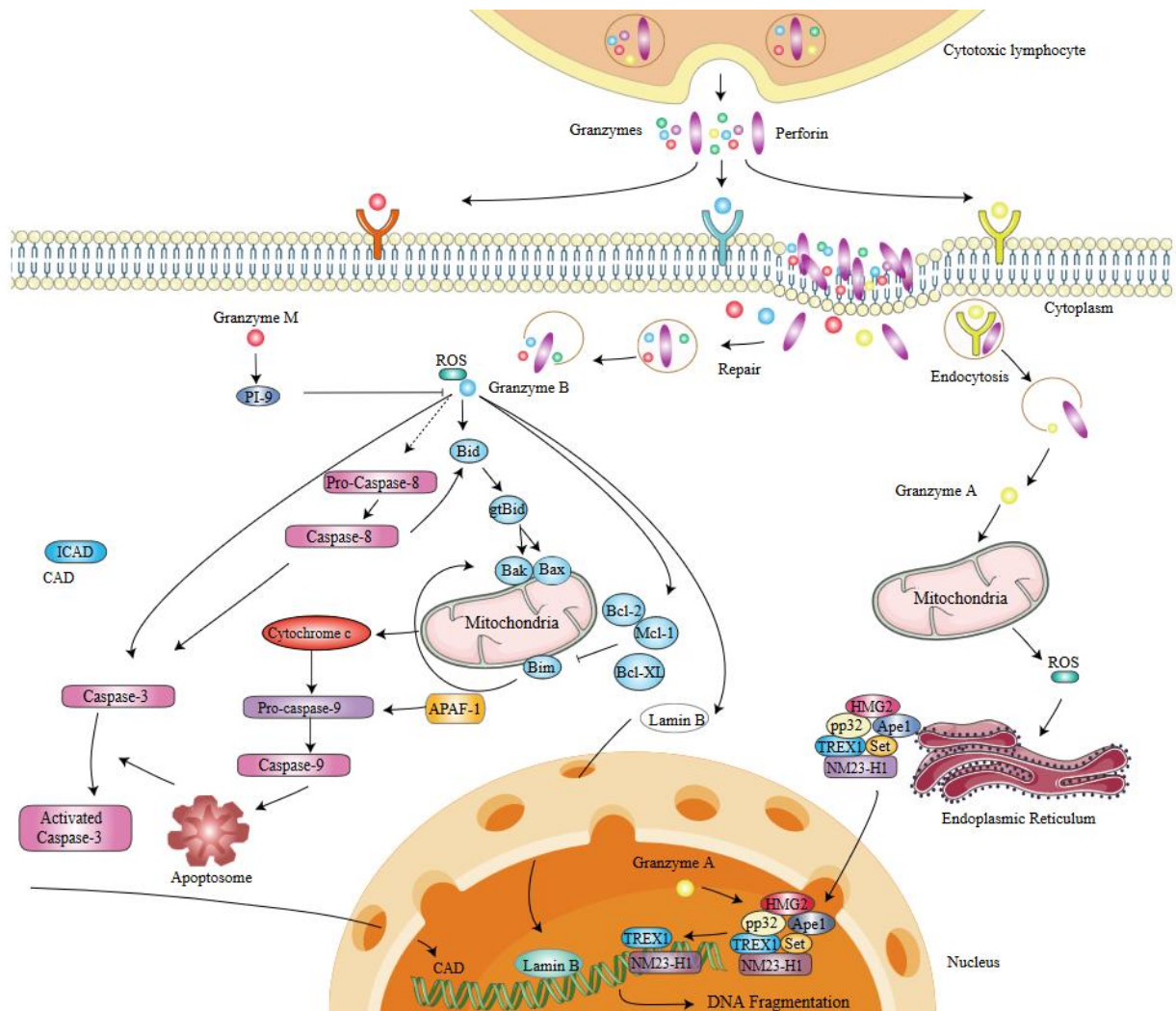
Les plus décrites fonctionnellement sont le granzyme A et le granzyme B (Pardo et al., 2009). La granzyme B induit une apoptose dépendante des caspases (Cullen and Martin, 2008). Les granzymes B sont connues pour être les plus efficaces des granzymes pro-apoptotiques car elles ciblent leur substrat rapidement. Elles sont caractérisées par un clivage après un résidu aspartique, comme les caspases. Des cellules cibles exposées à des nanomolaires de granzyme B recombinante (en présence de perforine recombinante) meurent par apoptose en 5 à 8 minutes (Heibei et al., 2000; Lopez et al., 2013a; Sutton et al., 2000, 2003). Les substrats des granzymes ont longtemps été controversés car ils divergent chez l'Homme et

la souris (Kaiserman et al., 2006). Cette étude a pu mettre en évidence que les granzyme B chez l'homme activent très efficacement la voie BID-dépendante (qui passe par les mitochondries et induit la production de cytochrome c) alors que les granzyme B de souris activent préférentiellement directement les caspases.

Les souris déficientes en granzyme B ont permis d'étudier plus en détail la voie induisant la mort des cellules par les granzymes A (Susanto et al., 2013) déjà connues comme pouvant fonctionner de façon caspase indépendante (Beresford et al., 1999). Après une entrée grâce à la perforine elles peuvent induire une athétose de la cellule, il s'agit d'une forme de mort dépendante du cytosquelette d'actine. La cellule va subir des mouvements continus qui vont finir par la tuer (Susanto et al., 2013). Les granzymes A ont aussi été décrite pour avoir un rôle dans la signalisation inflammatoire (Metkar et al., 2008).

En l'absence des granzyme A et B, les CTL sont toujours capables d'induire la mort des cellules cibles mais de façon encore plus lente que les granzymes A seules. Ce sont les granzyme M chez la souris et M et H chez l'Homme qui semblent prendre le relais (Ewen et al., 2013; de Poot and Bovenschen, 2014). Cependant, perturber cette voie n'a pas un effet majeur *in vivo* (Pao et al., 2005).

Une database illustre la complexité des granzymes en listant 1984 substrats de granzyme B possible (Rawlings et al., 2014). Dans l'ensemble les granzymes induisent l'apoptose analysable par des caractéristiques typiques telles que le blebbing (renflement irrégulier dans la membrane plasmique), une dysfonction des mitochondries, l'externalisation des phosphatidyl sérine et la fragmentation de l'ADN.



**Figure I.29 : Voie d'induction de l'apoptose par les granzymes**

<https://www.creative-diagnostics.com/perforin-granzyme-apoptosis-pathway.htm>

### L'accès des granzymes au cytosol de la cellule cible :

Quatre modèles ont été décrits pour expliquer l'entrée de granzymes dans les cellules cibles par la perforine (**Figure I.30**) :

**Modèle 1 (Figure I.30.a)** : La perforine s'oligomérisse en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  à la membrane plasmique de la cellule cible. Des approches de microscopie à rayons X et de cryo-microscopie électronique (Dourmashkin et al.), ont montré que les pores de perforine de diamètre de 16-22nm. Initialement ces pores ont été décrits comme inducteur de perturbations osmotiques entraînant la mort de la cellule cible.

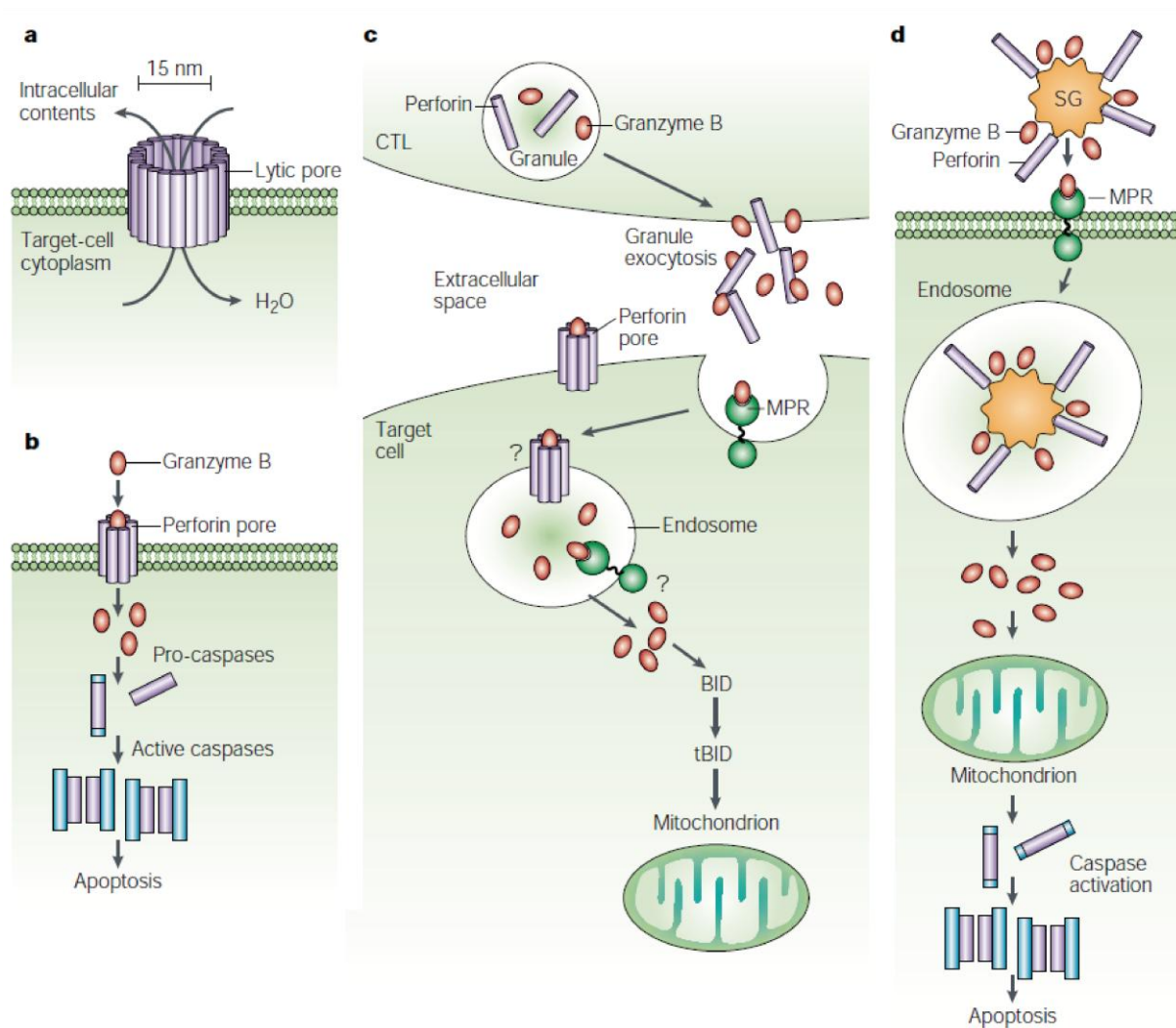
**Modèle 2 (Figure I.30.b)** : Ce modèle se base sur le premier. Les pores d'environ 15nm formés par la perforine peuvent laisser passer les granzymes avec un diamètre approximatif



de 4nm permettant leur diffusion dans le cytosol de la cellule cible (Baran et al., 2009; Law et al., 2010).

**Modèle 3 (Figure I.30.c) :** Il a été montré par plusieurs groupes que l'internalisation de granzymes dans les cellules peut être indépendante de la perforine (Froelich et al., 1996; Shi et al., 1997). Ce modèle implique le récepteur M6PR qui est nécessaire au transport des granzymes vers les granules lytiques dans le CTL qui serait exprimé ici par la cellule cible. La liaison des granzymes à leur récepteur déclenche une endocytose de ce complexe. La perforine pourrait alors s'oligomériser dans les endosomes pour permettre le passage des granzymes dans le cytoplasme (Motyka et al., 2000). Cependant la perforine s'active à pH neutre et en présence d'une forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , or le pH endosomal est acide et la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est faible (Gerasimenko et al., 1998) rendant ce modèle peu envisageable.

**Modèle 4 (Figure I.30.d) :** Enfin ce dernier modèle se base également sur l'endocytose et le M6PR avec cette fois l'endocytose d'un complexe macromoléculaire contenant les molécules lytiques et de la séroglycine. Dans ce modèle la perforine aurait un rôle de perturbateur du trafic endosomal (Metkar et al.).



**Figure I.30: Induction de l'apoptose des cellules cibles par la voie perforine-granzymes.** Schéma des 4 modèles d'action de la perforine pour permettre l'entrée des granzymes dans la cellule cible. Figure extraite de Trapani and Smyth, 2002.

### La granulysine :

Les CTL contiennent une autre protéine cytotoxique, la granulysine. Elle présente des homologies avec des hydrolases activatrices du système nerveux, les saposines et a donc été classée comme une protéine de la famille des protéines saposin-like (Krensky and Clayberger, 2009; Peña and Krensky, 1997).

Elle est produite sous une forme de 15kDa qui est ensuite clivée en une forme de 9kDa. La forme de 15 kDa est constitutivement sécrétée avec une fonction peu décrite. C'est la forme de 9kDa qui est exocytée par les granules lytiques (Hanson, 1999). Sa fonction principale est d'altérer les membranes bactériennes mais il a été montré qu'une forte concentration de granulysine peut avoir une activité anti-tumorale (Kaspar et al., 2001). Cette

forme est cytolytique mais peut aussi jouer le rôle de chimioattractant pour les LT, monocytes et autres cellules inflammatoires et activer l'expression de nombreuses cytokines (Deng et al., 2005). De façon similaire aux granzymes, la granulysine nécessite aussi la formation de pores par la perforine pour entrer dans les cellules cibles (Walch et al., 2014).

#### - Voie dépendante des récepteurs de mort

Le récepteur FAS (ou APO-1 ou CD95) est un membre de la famille des récepteurs au TNF (Itoh et al., 1991). Son ligand, FASL (ou CD95L) appartient à la famille des cytokines TNF (Suda et al., 1997).

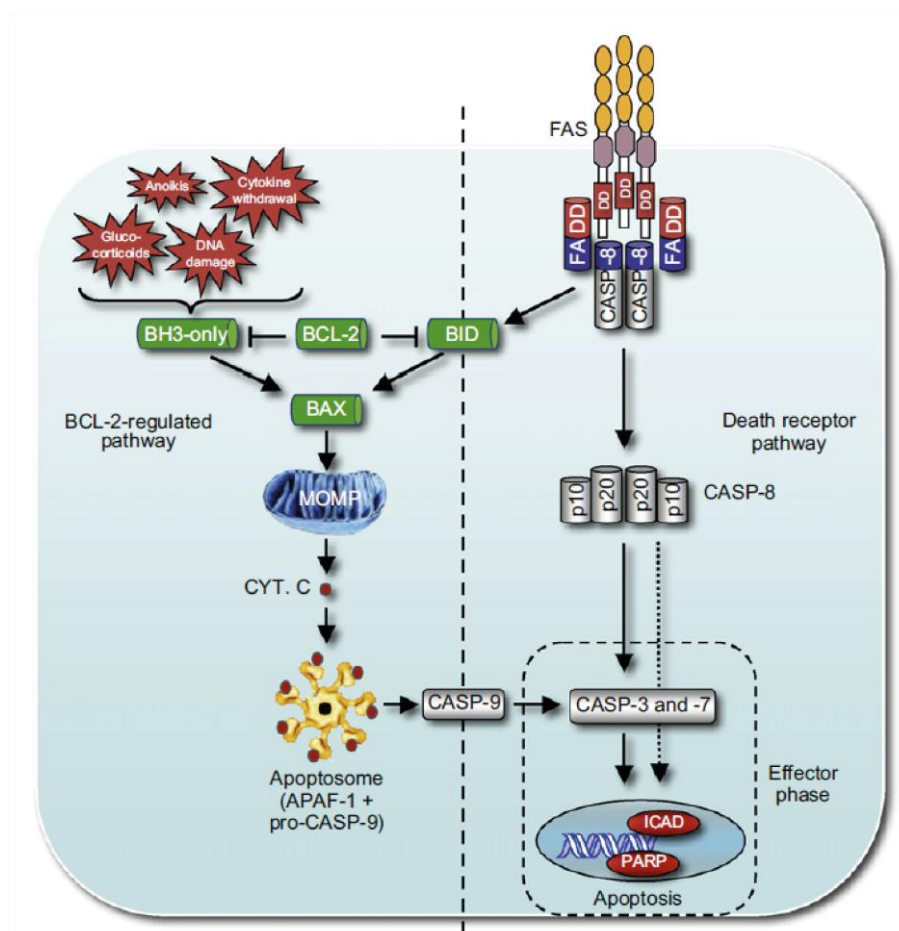
Une grande proportion des patients atteints d'ALPS (syndrome autoimmune lymphoprolifératif) ont des mutations au niveau du gène FAS, démontrant le rôle essentiel de la signalisation FAS-FASL dans le contrôle du système immunitaire (Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995). De plus, la déficience de FAS prédispose au développement de lymphomes, soulignant l'importance de cette voie dans la suppression tumorale dans le compartiment lymphoïde (Straus, 2001).

L'activation de FAS (exprimé par la cellule cible) par son ligand FASL (exprimé par les CTL) déclenche l'apoptose de la cellule cible. Outre son rôle dans l'apoptose de la cellule cible, la voie FAS/FASL est également impliquée dans l'AICD (mort induite par l'activation) : une restimulation de LT déjà activé peut en effet causer la mort par suicide ou fratricide qui engage cette voie. Ceci explique l'apparition de pathologies basées sur une lymphoprolifération en l'absence de FAS (Krammer, 2000; Nagata, 1997). La voie FAS-FASL est ainsi impliquée dans l'homéostasie des LT.

Au niveau moléculaire (**Figure I.31**), la liaison de FAS entraîne l'assemblage d'un complexe appelé DISC (death-inducing signaling complex) qui contient la caspase-8 (et la caspase-10 chez l'Homme) (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996), son activateur FADD et son modulateur c-FLIP (Boldin et al., 1995; Irmeler et al., 1997; Chinnaiyan et al., 1995). Le recrutement de FADD dans la région intracellulaire de FAS entraîne la dimérisation et le changement de conformation de la caspase-8 lui permettant d'atteindre une activité enzymatique optimale. La caspase-8 ainsi activée s'autoclive pour quitter le complexe DISC et atteindre d'autres substrats, notamment la caspase-3 et la caspase-7. La caspase-8 peut également cliver son substrat BID (protéine pro-apoptotique de la famille « BH3-only ») qui peut entrer dans les mitochondries et exercer sa fonction pro-apoptotique (**Figure I.31**). Les

protéines de la famille « BH3-only » et les protéines BAX sont les 2 sous groupes de la famille BCL-2. Ces 2 familles sont nécessaires à l'activation de la cascade de caspase conduisant à l'apoptose dite « BCL-2 régulée » ou « l'apoptose mitochondriale » ou encore « l'apoptose intrinsèque » (Green et al., 2004; Youle and Strasser, 2008). La protéine BCL-2 quant à elle, est un régulateur négatif de cette voie c'est une protéine anti-apoptotique qui va réguler négativement BH3-only et BID (**Figure I.31**).

L'activation des caspase-3 et 7 indépendamment ou non de la voie BID varie en fonction des types cellulaires, elle est essentielle dans les hépatocytes mais pas dans les cellules lymphoïdes par exemple (Kaufmann et al., 2007; McKenzie et al., 2008)



**Figure I.31 : Voie de signalisation induite par la voie FAS et sa régulation par BCL-2.** Détails des acteurs moléculaires impliqués dans l'induction de l'apoptose par la voie FAS/FASL.

Concernant la régulation de l'expression de FASL dans les CTL, son niveau d'expression en condition non activée (« resting ») est relativement faible. Mais quelques heures après stimulation du TCR, l'expression de FASL en surface est augmentée. Il a été proposé que FASL est exprimé et stocké dans les granules lytiques et serait, en parallèle de l'exocytose de

la perforine, exprimé en membrane. Cependant, le niveau d'expression basal de FASL étant faible son implication dans l'induction de l'apoptose de la cellule cible rapidement est difficilement envisageable. L'exposition membranaire de FASL suivrait donc 2 vagues, la première avec un pool de FASL pré-existant exposé à la membrane après stimulation et la 2<sup>ème</sup> par la synthèse *de novo* de la protéine (He and Ostergaard, 2007). Ces données suggèrent que la voie FAS-FASL interviendrait dans des phases plus tardives que la voie perforin-granzyme après contact CTL-cellule cible.

FASL a également été décrit comme soluble suite à un clivage par une métalloprotéinase (MMP), la matrilysine. Ce FASL soluble (sFASL) est actif car capable d'induire l'apoptose de cellules cibles épithéliales. Ces données révèlent un nouveau rôle des MMP, non pas dans la destruction de la matrice extracellulaire mais dans l'induction de l'apoptose de cellules épithéliales (Powell et al., 1999).

### **Mort de la cellule contact indépendante**

Après leur activation, en plus des voies perforine-granzyme et FAS-FASL, les CTL ont aussi des fonctions cytotoxiques par la sécrétion de cytokines, notamment l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  qui peuvent agir au niveau local ou systémique.

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine proinflammatoire qui possède 2 fonctions principales : l'inhibition de l'expression et la réplication de gènes viraux et l'initiation de la signalisation apoptotique (Wallach et al., 1999 ; Zheng et al., 1995). Après sécrétion le TNF- $\alpha$  se lie sur son récepteur, le TNF-R présent à la surface des cellules cibles. Ce récepteur fonctionne de façon similaire à FAS entraînant l'activation de la cascade de signalisation décrite pour la voie FAS-FASL **(Figure I.31).**

La mort cellulaire induite par le TNF- $\alpha$  est mineure comparée à ses multiples fonctions inflammatoires due à sa production par d'autres types de cellules immunitaires (macrophages).

L'IFN- $\gamma$  est principalement produit par les cellules NK, les NKT et les LT CD4<sup>+</sup> Th1 et les CTL. Un défaut de production et/ou de sécrétion de l'IFN- $\gamma$  conduit au développement de tumeurs, des phénomènes inflammatoires et auto-immuns. L'IFN- $\gamma$  augmente l'expression des molécules de CMHI sur les cellules cibles, augmentant leur possibilité d'être reconnu par

les CTL. Il augmente également l'expression de molécules d'adhésion nécessaires à la migration des leucocytes et notamment des cellules cytotoxiques les cellules NK. Enfin il favorise la différenciation en Th1 qui, elle, aide la fonctionnalité des CTL en induisant l'expression de T-bet, le facteur de transcription caractéristique des Th1(Schroder et al., 2004).

### **I.2.c) La synapse lytique sur le site infectieux/tumoral**

Après activation des LT CD8<sup>+</sup> par les CPA dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT CD8<sup>+</sup> augmentent l'expression du récepteur aux chimiokines inflammatoires, CXCR3, leur permettant d'entrer dans les tissus périphériques (Groom et al. 2011). Une fois sur le site infectieux, il est important de souligner que l'action des CTL est fortement soutenue par les LT CD4<sup>+</sup> et dans certains cas ils sont même nécessaire au recrutement des CTL dans le tissu(Nakanishi et al., 2009). De plus, il a été montré qu'une stimulation par les CPA, qui apportent les signaux de costimulation, est continue dans les tissus périphériques (Hufford et al., 2010).De nombreuses études ont ainsi rertranscrits l'importance du microenvironnement inflammatoire pour le maintien de l'activation des CTL dans les tissus. Cependant, quelques études seulement se sont concentrées sur l'activité cytotoxique des CTL directement dans le tissu infecté ou tumoral.

Il est admis que les CTL peuvent rapidement, en série ou même simultanément tuer plusieurs cellules cibles en quelques minutes (Wiedemann et al., 2006). S.Halleet *al.*, ont étudié comment l'accès aux cellules infectées dans les tissus pourrait impacter la capacité à tuer des CTL. Par des techniques d'imagerie bi-photonique ils ont pumonné que suite à une infection virale, les CTL tuent *in vivo* 2 à 16 cellules infectées par jour. De plus, les CTL forment des kinapses plutôt que des synapses stables quand ils tuent leurs cibles. En effet, des flux calciques de longue durée sont induits seulement dans certains CTL. Enfin, ils ont pu mettre en évidence que les CTL peuvent coopérer entre eux pendant le killing des cellules infectées(Halle et al., 2016).

Plusieurs études ont cherché à comprendre dans un contexte tumoral si le microenvironnement tumoral pouvait d'une part avoir un impact sur l'accès des CTL aux cellules cibles et d'autre part sur l'activité cytotoxique des CTL à la SI.

Le groupe de S. Amigorena a pu visualiser *in vivo* par microscopie intravitale, après le transfert adoptif de LT spécifique de l'ovalbumine, le rejet de tumeur (Boissonnas et al., 2007). Il a été observé 2 phases d'élimination de la tumeur. Durant la 1<sup>ère</sup> phase, les LT spécifiques de l'ovalbumine infiltrent la tumeur en périphérie. Ils sont peu mobiles et forment des contacts stables avec les cellules tumorales. Ces données suggèrent que la présence de l'antigène n'est pas nécessaire à l'infiltration initiale des CTL dans la tumeur. Cette 1<sup>ère</sup> phase conduit à l'élimination de la tumeur dans certaines zones. Dans ces zones, les CTL reprennent une mobilité plus importante, comparable à celle observée en absence d'antigène. Durant la phase tardive, la densité des CTL est plus importante dans les tumeurs qui expriment l'antigène, suggérant que celui-ci est nécessaire à la rétention des CTL au site tumoral (Boissonnas et al., 2007). Ces données corrélerent avec des études faites sur des échantillons de patients atteints de mélanome. Les auteurs ont montré par l'utilisation de tétramères de CMHp que parmi les LT CD8<sup>+</sup> infiltrants la tumeur, une fraction importante est spécifique des antigènes de mélanome (Romero et al., 2002). Une étude révèle également qu'en fonction de la localisation des lésions métastatiques donc du tissu environnement, la mobilité des CTL peut varier (Condeelis and Segall, 2003).

Enfin, l'équipe de P. Bousso a également étudié la dynamique des CTL et leur capacité cytotoxique dans un modèle murin de tumeur solide (Breart et al., 2008) par des techniques d'imagerie bi-photonique combinée à une approche d'analyse de la mortalité des cellules tumorales en « single-cell ». Ils ont utilisé une lignée cellulaire tumorale modifiée qui exprime la CFP et l'YFP lié par un motif DEVD. L'apoptose des cellules tumorales active la caspase-3 qui clive DEVD et perturbe le transfert d'énergie entre les 2 protéines fluorescentes (FRET). Cette technique de FRET peut être mesurée par microscopie intravitale en temps réelle et sur cellule individuelle. Des CTL spécifiques de la tumeur ont été ajoutés (transfert adoptif). Ces techniques d'imagerie ont permis de répondre à une des questions principales sous-jacente au transfert adoptif de CTL, à savoir si les CTL transférés par cette approche tuent directement les cellules tumorales ou sont impliqués dans le recrutement d'autres cellules immunitaires permettant d'éliminer la tumeur. Ils ont pu visualiser que les CTL transférés sont capables de tuer directement les cellules tumorales.

Cependant, et de façon étonnante, cette cytotoxicité est relativement longue avec une moyenne de 6h pour tuer une cellule tumorale. Les CTL semblent rester en contact avec les cellules tumorales apoptotiques durant plusieurs heures. Ces données suggèrent que ce taux relativement faible de killing limite l'efficacité d'élimination de la tumeur. Dans ce contexte, de multiples facteurs constituant le microenvironnement tumoral peuvent intervenir dans la modulation de l'activité cytotoxique des CTL. Il est intéressant de corréler la résistance relative des cellules tumorales à la cytotoxicité des CTL à la SI dans ce contexte *in vivo*, avec des travaux de l'équipe de S.Valitutti montrant une relative résistance des cellules de mélanome *in vitro* par une altération des molécules lytiques des CTL à la SI (Caramalho et al., 2009; Khazen et al., 2016).

Des études faites dans les nœuds lymphatiques soulignent l'importance du microenvironnement dans l'activité des CTL. En effet, dans ce contexte il a été montré que les CTL peuvent tuer des cellules cibles et stopper le contact en un minimum de temps de 15min et en moyenne en moins d'1h (Mempel et al., 2004).

En plus du contexte microenvironnemental, une variabilité de la capacité cytotoxique à l'échelle cellulaire a été mise en évidence. En effet, à l'échelle polyclonale et intracлонаle les CTL peuvent répondre de façon hétérogène en termes d'expansion et de différenciation. En corrélation avec ces données, Vasconcelos *et al.* ont mis en évidence une variabilité de la capacité cytotoxique des CTL intracлонаle grâce à un test permettant de mesurer la cinétique de l'activité cytotoxique de CTL individuel appartenant à la même population clonale (spécifique d'un même peptide antigénique)(Vasconcelos et al., 2015). Cette approche expérimentale leur a permis de décrire une hétérogénéité de l'activité lytique des CTL parmi les CTL provenant de la même population clonale. Une sous population s'est distinguée de la population totale par une forte capacité de killing.



### **I.3. L'immunosurveillance anti-tumorale**

#### **I.3.a) Le concept du « cancer immunoediting »**

Dans les années 1960, la découverte de l'existence d'antigènes tumoraux a conduit Burnet et Thomas à proposer l'hypothèse de l'immunosurveillance des cancers selon laquelle le système immunitaire permettrait de prévenir l'apparition de cancer chez les individus immunocompétents. Cependant, des études montrèrent par la suite que la susceptibilité de souris immunocompétentes au développement d'un cancer comparé à des souris nude immunodéficientes était similaire. La similarité des cellules tumorales par rapport aux cellules saines a rendu l'exploration de ces données compliquées. L'hypothèse d'immunosurveillance des cancers fut alors abandonnée. Il faudra attendre les années 1990 pour une amélioration des modèles murins d'immunodéficiency basé sur des fonds génétiques pures pour réévaluer le rôle de l'immunité dans le contrôle du cancer. Une des premières découvertes fut l'importance de l'IFN- $\gamma$  dans le rejet de cellules tumorales transplantées (Dighe et al. 1994). La démonstration que l'absence d'IFN- $\gamma$  (souris déficientes en IFN- $\gamma$  ou son récepteur) ou l'absence de système immunitaire adaptatif (souris déficientes pour la recombinaison RAG) augmente la susceptibilité au développement tumoral fut par la suite une découverte majeure (Kaplan et al., 1998 ; Shankaran et al., 2001). Ces données ont ensuite pu être corrélées avec l'observation chez l'Homme que l'infiltrat lymphocytaire corrèle avec une meilleure survie des patients (Al-Batran et al., 2005; Clemente et al., 1996). L'immunologie des tumeurs fait alors l'objet de nombreuses études dans le but de développer de nouvelles thérapies, les immunothérapies. Le fondement de l'immunosurveillance des cancers est l'expression par les cellules tumorales d'antigènes différents par rapport aux cellules non transformées (Knuth et al., 1984; Sahin et al., 1995). Les antigènes tumoraux peuvent être de différents types :

- Des antigènes de différenciation cellulaire (tels que les antigènes de différenciation des mélanocytes)
- Des antigènes provenant de protéines mutées (tels que p53)
- Des antigènes surexprimés (tels que HER-2)
- Des antigènes viraux (tels que les protéines du papillomavirus)

- Des antigènes exprimés par les cellules germinales de testicule et d'ovaire non exprimés dans les cellules somatiques (tels que MAGE et NY-ESO-1)

En 2001, une découverte majeure conduit à l'hypothèse que le système immunitaire peut jouer un rôle protecteur anti-tumoral mais aussi qu'il « sculpte » la tumeur durant son développement. Cette hypothèse se base sur l'observation qu'en l'absence de système immunitaire les tumeurs développées sont plus immunogènes que des tumeurs similaires développées dans des souris immunocompétentes. Le système immunitaire contrôle non seulement la « quantité » de la tumeur mais aussi sa « qualité » (Dunn et al., 2002). La tumeur subit ce qu'on pourrait appeler une pression de sélection, c'est le concept de « cancer immunoediting ». Ce concept se découpe en 3 phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (**Figure I.32**).

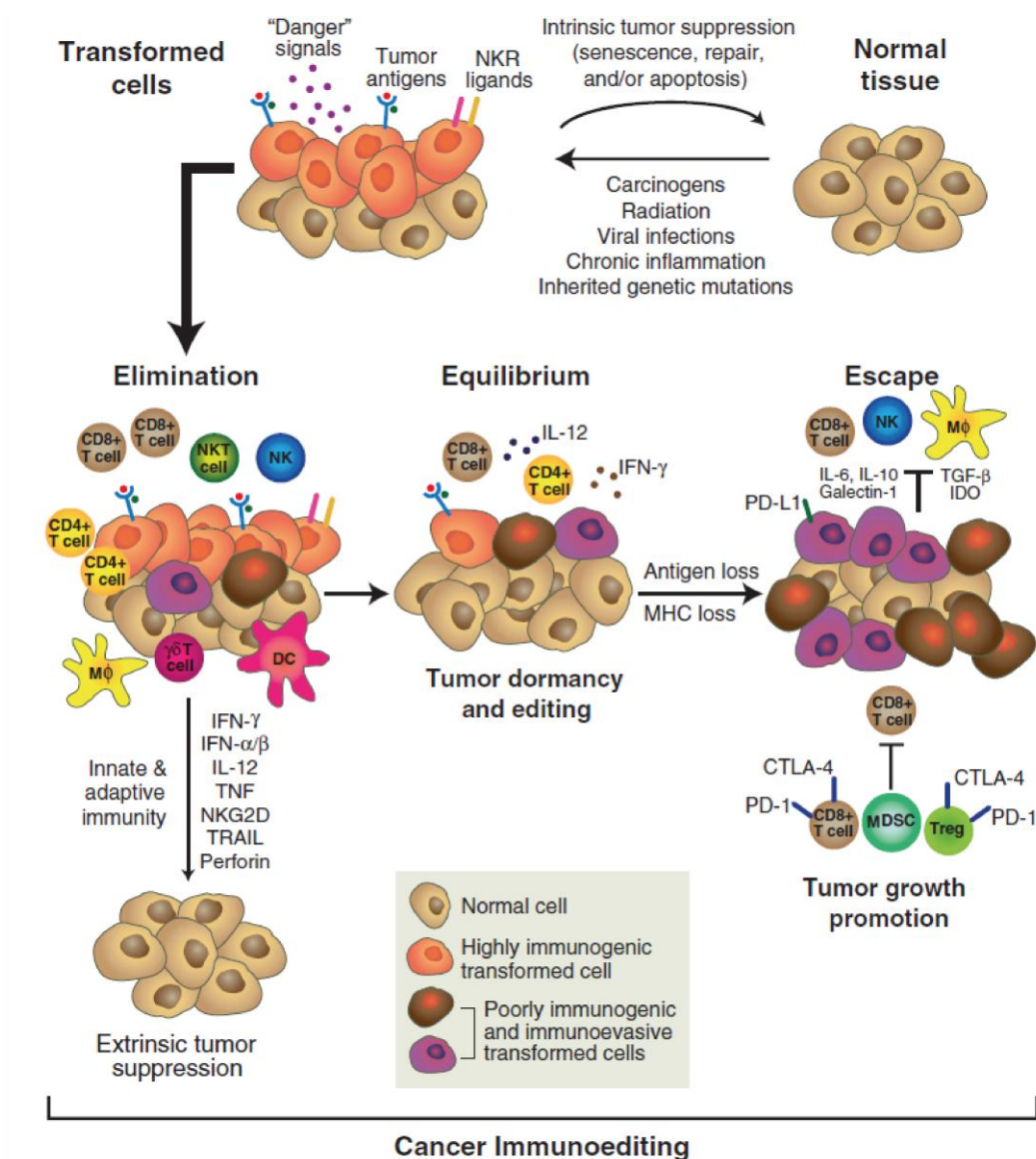


Figure I.32 : Le concept du « cancer immunoediting » (Schreiber et al., 2011)

- **L'élimination (Figure I.32) :**

Le système immunitaire inné et adaptatif détecte la tumeur et l'élimine avant tout symptômes cliniques. La détection de la tumeur à cette étape passe par la détection de signaux de danger tel que l'IFN de type I (Matzinger, 1994), des signaux de dommages cellulaires (les DAMP, tel que HMGB1) ou tissulaires (Sims et al., 2010), et des molécules de stress (tels que MICA/B) fréquemment exprimés à la surface des cellules tumorales (Guerra et al., 2008). Des cytokines pro-inflammatoires sont produites notamment par les macrophages et les cellules stromales. Ces ligands activent une première réponse immunitaire notamment les cellules NK, les cellules NKT ou les LT  $\gamma\delta$ . Ce micro-environnement pro-inflammatoire entraîne une boucle de retrocontrôle positif et induit le recrutement d'autres cellules immunitaires qui elles-mêmes produisent d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12. L'IFN- $\gamma$  joue également un rôle direct sur les cellules tumorales par un effet anti-prolifératif, anti-angiogénique et pro-apoptotique. La cytotoxicité induite par les cellules NK induit le relargage d'antigènes permettant la mise en place d'une réponse adaptative spécifique de la tumeur. Les DC sont ainsi activées par les antigènes tumoraux relargués lors de l'apoptose des cellules tumorales, elles mûrissent et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour induire l'activation des LT CD4<sup>+</sup>. Ces cellules vont quant à elles contribuer aux mécanismes effecteurs des LT CD8<sup>+</sup>, notamment par la production d'IL-2. Les CTL ainsi activés induisent la cytotoxicité spécifique des cellules tumorales et produisent de l'IFN- $\gamma$  qui en retour peut activer les macrophages, d'autres DC et les cellules NK. Si la tumeur est éliminée, cette étape est la 1<sup>ère</sup> et dernière du processus de « cancer immunoediting » (Vesely et al., 2011).

- **L'équilibre (Figure I.32) :**

Certaines cellules tumorales peuvent survivre à la phase d'élimination et entrent alors dans une phase d'équilibre (Aguirre-Ghiso, 2007). Cet état dit de dormance se caractérise par l'absence de progression tumorale et de symptômes cliniques (Chambers et al., 2002; Heyn et al., 2006). Il est défini par une balance entre la prolifération et la mort des cellules tumorales. Cet état est particulièrement intéressant car comprendre la transition entre l'équilibre et l'échappement peut apporter des informations sur l'évolution de la pathologie notamment dans le cas des rechutes après une première élimination de la tumeur. Il existe 2 niveaux de dormance, la dormance de la masse tumorale et la dormance à l'échelle de la cellule tumorale (**Figure I.33**). En effet, il a été proposé que la majorité des

patients avec des cas de rechutes ont un temps de dormance d'environ 5 ans avant la rechute (Klein and Hölzel, 2006).

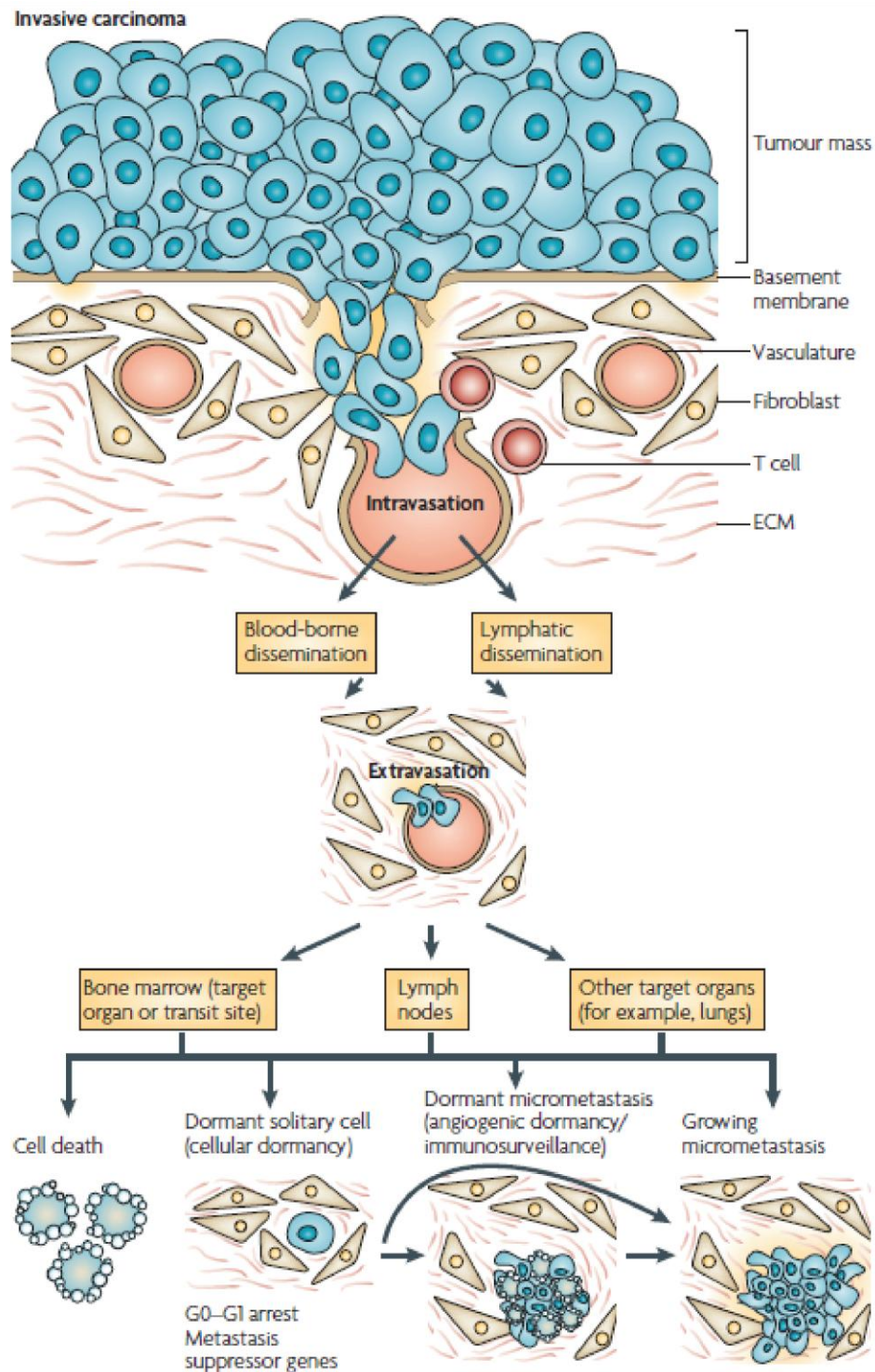
Différents paramètres influencent l'état de dormance. Tout d'abord, à l'échelle de la cellule tumorale des facteurs génétiques sont impliqués. Les cellules tumorales développent les propriétés adéquates à leur survie dans un environnement particulier. Dans de nombreux cas, la période de latence est attribuée à l'accumulation lente d'altérations génétiques conduisant à l'immortalisation (état d'une cellule incapable d'entrer en sénescence, cellule immortalisée), telles que la perte de *TP53* ou *p16*, et conduisant à la transformation cellulaire telles que les mutations activatrices de la voie Ras (Hanahan et al., 2000).

Un second facteur impliqué dans le maintien de l'état de dormance est le microenvironnement. Les cellules tumorales se trouvent ainsi dans une niche favorable à l'état de quiescence. Plusieurs équipes ont montré que la dérégulation des interactions réciproques entre le microenvironnement et les cellules tumorales oriente vers la prolifération ou au contraire l'arrêt de la croissance cellulaire (Boudreau and Bissell, 1998 ; White, 2004). La vascularisation et les interactions avec les cellules du système immunitaire sont particulièrement impliquées comme décrits ci-dessous :

- L'état de dormance est dépendant de la disponibilité en nutriments et en oxygène apportés par les vaisseaux sanguins. Certaines cellules tumorales sont incapables de recruter de nouveaux vaisseaux sanguins pour apporter plus de nutriments qui entraînerait une croissance plus importante de la tumeur et la sortie de cet état de dormance (Langer et al., 2018). En l'absence de ce phénomène, la totalité de la masse tumorale n'est pas fournie en nutriments et oxygène et est à l'origine d'un état d'hypoxie qui déclenche la mort des cellules tumorales (Semenza, 2003). Si la mort des cellules tumorales excède la division cellulaire, la lésion régresse. Cependant, dans les tumeurs incapables de recruter des vaisseaux sanguins, si la fraction de cellules mortes est égale à celle qui se divise, il n'y a pas d'augmentation de la masse tumorale, c'est le résultat d'une dormance angiogénique (Naumov et al., 2006).

Enfin, durant cette phase, le système immunitaire exerce une pression de sélection qui aura également des conséquences sur l'immunogénicité des cellules tumorales (Wheelock et al., 1981). En effet, il a été proposé que l'interruption de l'état de dormance dans les lymphomes et leucémies résulte de la réduction de l'expression d'antigènes associés à la tumeur (Matsuzawa et al., 1991). Un autre mécanisme majeur sur lequel se base les

immunothérapies actuelles est l'augmentation de l'expression de la molécule inhibitrice de la signalisation du TCR, PD-L1 (ou B7H1 ou CD274). Ceci entraîne une altération de la fonction des CTL (Saudemont et al., 2004). D'autres études ont permis de montrer une action coordonnée des réponses LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> qui contrôle la croissance tumorale (Mahnke et al., 2005 ; Feuerer et al., 2001). L'ensemble de ces travaux montrent donc qu'il existe une balance entre l'activation du système immunitaire permettant de prévenir une trop forte croissance tumorale et son inhibition permettant aux cellules tumorales de survivre dans cet état dit d'équilibre. C'est durant cette étape que l'on parle d'«editing», le système immunitaire par la pression qu'il exerce « sculpte » l'immunogénicité de la tumeur.



**Figure I.33 : L'état de dormance, un composant de la progression tumorale.** Les cellules tumorales acquièrent des propriétés invasives et peuvent dégrader la membrane basale et envahir le stroma. Les cellules tumorales invasives interagissent avec des fibroblastes ou des cellules immunitaires. Les cellules tumorales peuvent dégrader la matrice extracellulaire et envahir les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Elles peuvent regagner la moelle osseuse qui peut servir de site à partir duquel les cellules tumorales peuvent continuer à se disséminer ou regagner directement un organe cible où elles forment des métastases. A ce stade elles peuvent mourir, entrer dans un stade de quiescence, soit forme une lésion

micrométastatique qui prolifère mais ne recrute pas de nouvelles vascularisations. Figure extraite de Aguirre-Ghiso, 2007.

- **L'échappement (Figure I.32) :**

A ce stade, les cellules tumorales ont mis en place des mécanismes permettant d'échapper à la surveillance immunitaire. L'échappement se base sur 3 mécanismes : la diminution de l'expression de molécules détectées par le système immunitaire, l'inactivation des cellules immunitaires et la résistance aux mécanismes effecteurs induit par le système immunitaire. Ces mécanismes sont détaillés dans la partie I.4.b ci-dessous.

Il est important de noter que dans certains cas les cellules tumorales peuvent entrer directement dans la phase d'équilibre ou d'échappement. L'étude de ces 3 phases permet une meilleure compréhension de l'interaction du système immunitaire avec la tumeur et a conduit au développement des immunothérapies pour agir sur la phase d'échappement.

### **I.3.b) Les mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire**

L'état d'équilibre précédemment présenté peut conduire au développement de cellules tumorales capables de résister à la pression de contrôle du système immunitaire, c'est l'immunosélection. Elles se différencient des autres cellules tumorales par la mise en place de mécanismes moléculaires capables de contrer la surveillance tumorale, elles survivent, prolifèrent et conduisent à des symptômes cliniques. Les mécanismes mis en place par la tumeur pour altérer le système immunitaire sont schématisés dans la **Figure I.34**. Tous ces mécanismes induisent un microenvironnement immunosuppresseur favorable à la croissance tumorale.

Tout d'abord les cellules tumorales altèrent les mécanismes permettant aux cellules immunitaires de les reconnaître et ainsi de s'activer. Elles sont capables de diminuer l'expression de protéines impliquées dans la machinerie de présentation antigénique par le CMH I, telles que des sous unités du protéasome (LMP2 et LMP7), TAP et la tapasine (Garrido et al., 1997; Hicklin et al., 1999) **Figure I.34(1)**. Cette diminution de la présentation antigénique altère la reconnaissance de la tumeur par les CTL et a été montré comme ayant un rôle dans l'augmentation de la masse tumorale et des métastases (Maeurer et al., 1996).

La diminution de l'expression de molécules de costimulation par les cellules tumorales est un autre mécanisme permettant d'altérer la fonction des LT. Sans signal de co-stimulation l'engagement du TCR induit l'anergie ou la tolérance des LT (Staveley-O'Carroll et al., 1998). Les cellules tumorales sont également capables d'altérer la voie des récepteurs de mort induite par les CTL par une diminution de l'expression d'acteurs moléculaires impliqués dans cette voie (la caspase-8 par exemple) ou par des mutations de gènes codant pour cette voie (par exemple une surexpression de FLIP, un inhibiteur de la caspase-8) ou une diminution de l'expression des récepteurs (Ochsenbein, 2005). Les cellules tumorales peuvent également induire l'apoptose des cellules immunitaires par l'expression des ligands aux récepteurs de mort (ligands de FAS et de TRAIL) (**Figure I.34(2)**).

En plus des mécanismes moléculaires intrinsèques aux cellules tumorales, celles-ci est capable de recruter des cellules immunitaires qui contrôlent et diminuent l'activité d'autres cellules immunitaires. Les cellules tumorales sécrètent des molécules permettant de recruter des cellules immunitaires immunomodulatrices (MDSC, TAM, TAN) et des Treg, inhibant les cellules NK et des CTL (**Figure I.34(3)**).

Parmi ces cellules immunomodulatrices on retrouve, les macrophages associés aux tumeurs (TAM)  $CD11b^+ F4/80^+$  qui produisent des médiateurs moléculaires inhibiteurs de l'activité des CTL et cellules NK tels que l'arginase-1, IL-10,  $TGF\beta$ ,  $PGE_2$  (Guiducci et al., 2005). Ils produisent également d'importante quantité de VEGF (vascular endothelial growth factor). L'ensemble de ces médiateurs joue un rôle important dans la stimulation de la croissance tumorale (Mantovani and Sica, 2010; Sica et al., 2008; Vankempen, 2003).

Concernant le recrutement des MDSC (Myeloid derived suppressor cells) dans les lésions de mélanome, leur accumulation est dépendante du milieu inflammatoire. La réduction de médiateurs de l'inflammation chronique par des inhibiteurs pharmacologiques permet de réduire la quantité de MDSC et diminue l'immunosuppression générée dans la tumeur (Umansky and Sevko, 2012) (**Figure I.34(3)**).

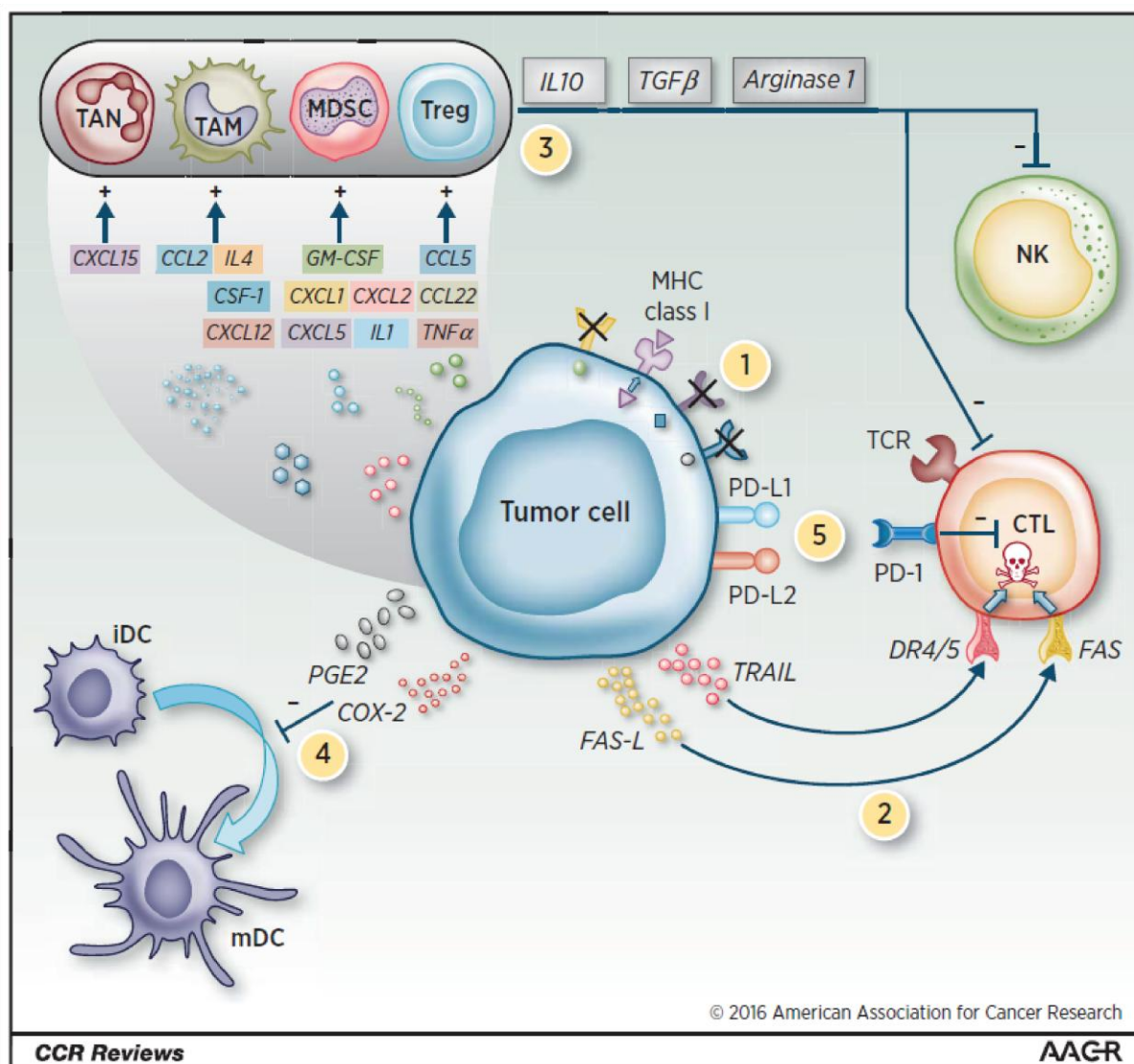
Les LT régulateurs  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  sont des cellules immunosuppressives qui ont été montrées comme jouant un rôle important dans l'échappement tumoral. En effet, chez patients atteints de mélanome ou de carcinome ovarien, la présence de Tregs  $CD4^+CD25^+$  corrèle avec une réduction du taux de survie des patients (Curiel et al., 2004; Viguiet et al., 2004). En accord avec ces résultats, la déplétion *ex vivo* des Treg de la population des lymphocytes infiltrants la tumeur (TIL) augmente la lyse des cellules tumorales par les



cellules NK dans des modèles de carcinome rénal ou de mélanome (Ghiringhelli et al., 2005a). Les réponses des TIL sont restaurées *ex vivo* par l'inhibition de 2 enzymes immunosuppressives produites par les cellules tumorales : l'arginase-1 et NOS2 (nitric-oxide synthase 2)(Bronte et al., 2005). De plus, il a été montré que les Tregs de tumeur ont une activité suppressive plus importante que les Tregs naturels soulignant l'impact du microenvironnement tumoral sur les cellules immunitaires (Curiel et al., 2004) (**Figure I.34(3)**).

L'activation des LT dans le microenvironnement tumoral est altérée par la présence de CPA tolérogènes. En effet, la tumeur contient plusieurs facteurs tels que le VEGF, IL-6, IL-10, TGF $\beta$ , M-CSF, NOS2, arginase-1, IDO, PGE<sub>2</sub>, COX2 qui peuvent inhiber la différenciation, la maturation et la fonction des DC (Zou, 2005) (**Figure I.34(4)**). Les DC locales semblent être immunosuppressives plutôt qu'immunomodulatrices et stimulent la différenciation des T<sub>reg</sub> notamment par la production de TGF $\beta$  (Ghiringhelli et al., 2005b).

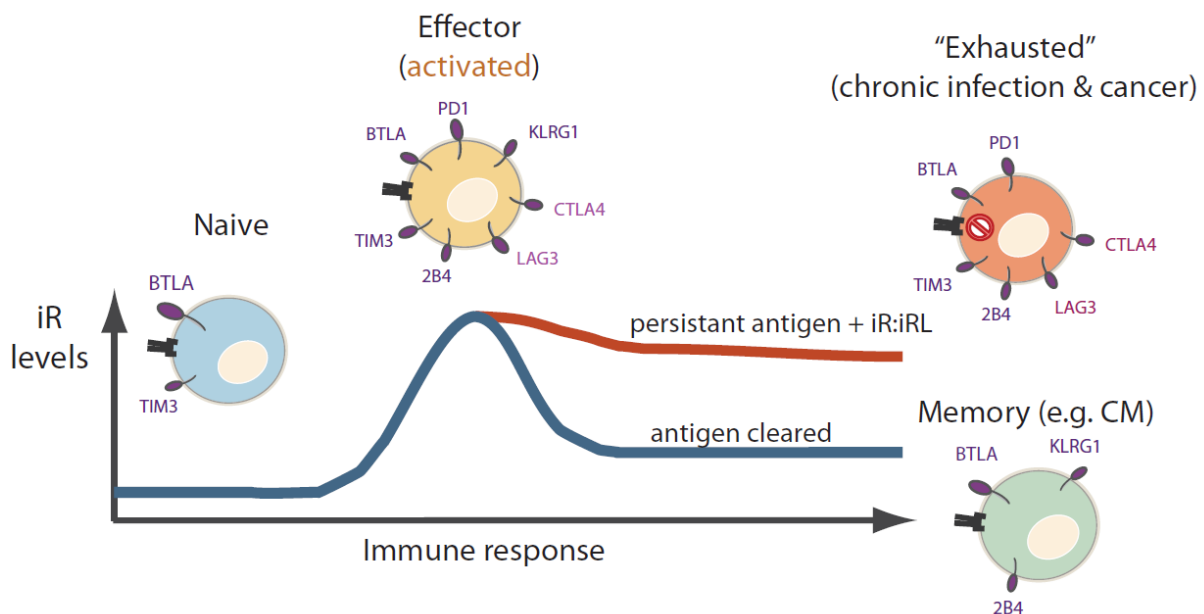
Enfin, le dernier mécanisme d'échappement au système immunitaire décrit et particulièrement intéressant car au cœur du développement de plusieurs immunothérapies est l'expression de ligands aux molécules de co-signalisation inhibitrices des LT : PD-L1 et CTLA-4 (**Figure I.34(5)**). Ces molécules agissent sur la voie de transduction du signal du TCR détaillé en partie I.1.c.



**Figure I.34 : Les mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire.** Plusieurs mécanismes impliquant de nombreux composants immunitaires contribuent à l'échappement tumoral. **(1)** Les cellules tumorales peuvent altérer leur reconnaissance par les cellules du système immunitaire par divers mécanismes qui interfèrent avec la présentation antigénique par les molécules de CMH I. **(2)** Les cellules tumorales peuvent induire l'apoptose de cellules immunitaires par l'expression de ligands aux récepteurs de mort. **(3)** Les cellules tumorales relarguent dans le micro-environnement des molécules immuno-modulatrices qui inhibent le système immunitaire (telles que l'IL-6 et l'IL-10) par le recrutement de cellules immunosuppressives telles que les Tregs, les TAN, les TAM et les MDSC qui inhibent l'activité cytotoxique des CTL et des cellules NK. **(4)** Ces molécules, combinées à la sécrétion de TGF- $\beta$ , COX-2 et PGE2 inhibent la différenciation et la maturation des DC. **(5)** La perturbation de l'expression de ligands aux immune checkpoint par les cellules tumorales déclenche des signaux inhibiteurs aux LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> altérant leur réponse anti-tumorale spécifique. Figure extraite de Chabanon et al., 2016.

## Conséquences sur les LT CD8<sup>+</sup> : caractérisation du phénotype « exhausted »

L'ensemble de ces mécanismes désactive les CTL. Les CTL sont présents mais inactifs, on parle de phénotype de cellules « exhausted ». En cas d'élimination de la tumeur (ou du pathogène), les antigènes disparaissent, l'expression des molécules de signalisation co-inhibitrices ou récepteurs inhibiteurs (immune checkpoint) est augmentée afin de contrôler et de stopper la réponse immunitaire (**Figure I.35**). Des cellules centrales mémoires sont générées et l'expression des récepteurs inhibiteurs diminue. Dans le cas d'une tumeur en phase d'échappement au système immunitaire, l'antigène persiste, les LT ne sont pas correctement activés et survivent dans cet état que l'on pourrait traduire d'épuisement (**Figure I.35**). Cet état se caractérise principalement par une signature moléculaire particulière : l'augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs tels que PD1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA (Baitsch et al., 2011; Fourcade et al., 2012; Yi et al., 2010) alors appelés des marqueurs « d'épuisement ».



**Figure I.35 : Niveau d'expression des récepteurs inhibiteurs (iR) durant la phase effectrice** qui peut se différencier en réponse immunitaire aigue ou chronique(Fuertes Marraco et al., 2015)

Ces cellules dites épuisées sont ainsi au cœur des recherches anti-tumorales actuelles afin de comprendre comment les réactiver mais aussi d'identifier leur potentiel rôle de biomarqueurs dans le pronostic des patients. En effet, il a été montré que l'expression de PD1 par les TIL est associée à un stade avancé de la pathologie et une réduction de la survie

globale dans le carcinome rénal (Thompson et al., 2007), le lymphome folliculaire (Richendollar et al., 2011) et les sarcomes (Kim et al., 2013). D'autres études ont montré au contraire que l'expression de PD1 n'était associée à aucuns bénéfices cliniques notamment dans le mélanome (Krönig et al., 2012). Cependant, de nombreuses études ont également analysé PD-L1 dont les résultats révèlent également des différences. Dans le cas du mélanome, l'expression de PD-L1 est cette fois de bon pronostic (Hino et al., 2010) et corrèle avec un infiltrat important des CTL (Taube et al., 2012).

L'augmentation de l'expression de LAG3 a été associée à un mauvais pronostic dans le cancer colorectal (Chen and Chen, 2014) et la leucémie lymphoïde chronique (Kotaskova et al., 2010).

Enfin, TIM3 a été associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de lymphome folliculaire (Gravelle et al., 2016) cancer de la prostate (Piao et al., 2013), cancer rénal (Yuan et al., 2014), cancer gastrique (Jiang et al., 2013) et cancer des cervicales (Jiang et al., 2013).

L'ensemble de ces résultats rend difficile la conclusion sur la valeur pronostic des immune checkpoint dans le cancer. S. Marraco et al., suggèrent que ces récepteurs ont une valeur de bon pronostic uniquement lorsque des réponses immunitaires sont mises en place dans la tumeur. A l'inverse, dans des cancers où la réponse immunitaire est relativement faible, par exemple dans les tumeurs qui expriment constitutivement PD-L1, leur présence serait de mauvais pronostic (Fuertes Marraco et al., 2015).

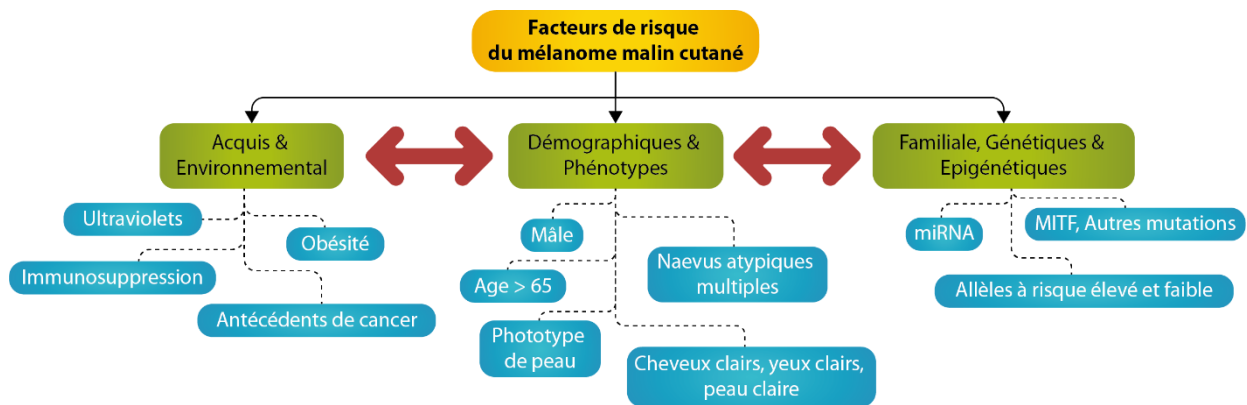
## **I.4. Le mélanome, un cancer immunogène**

### **I.4. a) Développement**

Il existe deux types de cancers de la peau : le carcinome cutané (ou carcinome non mélanocytaire) et le mélanome. Les carcinomes cutanés sont les plus fréquents, ils se développent à partir des kératinocytes et ne métastasent que rarement à l'inverse du mélanome caractérisé par sa forte capacité à métastaser. Or la sévérité des cancers est principalement due à la croissance de métastases qui altèrent les fonctions des organes vitaux. Un essai clinique de phase II en 2008 avaient estimé la moyenne de survie de patients atteints de mélanome métastatique de 6,2 mois (Korn et al., 2008). Bien que ne représentant qu'1% des tumeurs malignes de la peau, le mélanome cutané est la forme la plus agressive des cancers de la peau.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'incidence du mélanome a augmenté ces dernières décennies avec 132000 mélanomes malins enregistrés chaque année dans le monde. En France, l'incidence du mélanome est de 3 à 15 cas pour 100 000. Malgré une augmentation de la prévention visant à encourager la réduction de l'exposition aux UV l'incidence du mélanome continued'augmenter et plus rapidement que d'autres cancers.

Le mélanome cutané est une maladie multifactorielle qui regroupe des facteurs environnementaux, phénotypiques et familiaux (**Figure I.36**). Un des facteurs individuels phénotypiques connu comme un facteur particulièrement impliqué est le type de peau (ou phototype). Il définit des réactions au soleil particulières allant de coups de soleil systématiques aux coups de soleil rares dont le nombre est un facteur de risque important. Mais, un seul facteur reste insuffisant pour expliquer le développement de la pathologie, la mélanomagenèse résulte ainsi de l'interaction de multiples facteurs dans un microenvironnement particulier (Mo et al., 2019).



**Figure I.36 : Facteurs de risque de développement d'un mélanome.** Figure adaptée de Azoury and Lange, 2014.

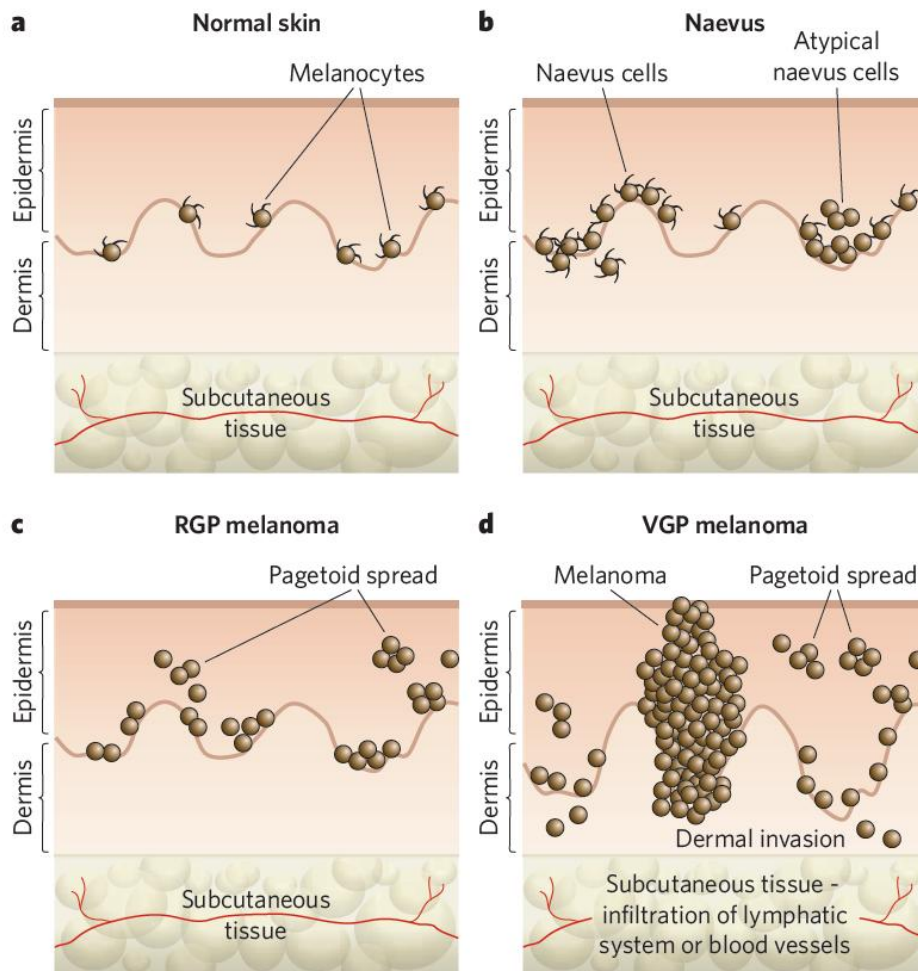
La peau est un organe complexe composé de 3 couches, l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme et le derme sont séparés par la couche basale. Dans l'épiderme, les kératinocytes constituent une première barrière à l'environnement extérieur. Il est en permanence renouvelé par des cellules provenant de la couche basale. Le derme composé principalement de fibroblastes et vaisseaux sanguins apporte nutriments, rigidité et densité à la peau.

Les mélanocytes sont localisés au niveau de la jonction épiderme-derme (**Figure I.37a**). Ce sont des cellules productrices de mélanine contenue dans des vésicules appelées les mélanosomes. La fonction des mélanocytes est de distribuer la mélanine aux kératinocytes, en réponse aux UV. Malgré la nature dynamique de la peau caractérisée par des événements de prolifération, différenciation et migration des kératinocytes, la prolifération des mélanocytes est quant à elle finement contrôlée et rarement observée en conditions physiologiques.

En effet, une prolifération des mélanocytes est visible puisqu'elle conduit à la formation de naevus mélanocytaire (**Figure I.37b**). Les naevus mélanocytaires communs sont acquis durant les 30 premières années de la vie alors que les naevus congénitaux sont présents dès la naissance. Le naevus dysplasique ou atypique est bénin mais constitue un facteur de risque de développement de mélanome et peut en être le précurseur.

Le développement du mélanome a été décrit suivant 5 stades (Clark, 1991). Durant les premiers stades de développement, stade 0 à 2, les cellules de mélanome prolifèrent localement, c'est la phase de croissance radiale (**Figure I.37c**). Les cellules vont ensuite suivre une phase de croissance verticale et atteindre les vaisseaux sanguins et lymphatiques

(stade 3). Cette invasion conduit au stade métastatique. C'est le stade 4 de la maladie, il caractérise la sévérité de ce cancer qui suit une forte tendance à la génération de métastase (Gray-Schopfer et al., 2007; Hsu et al., 2002).

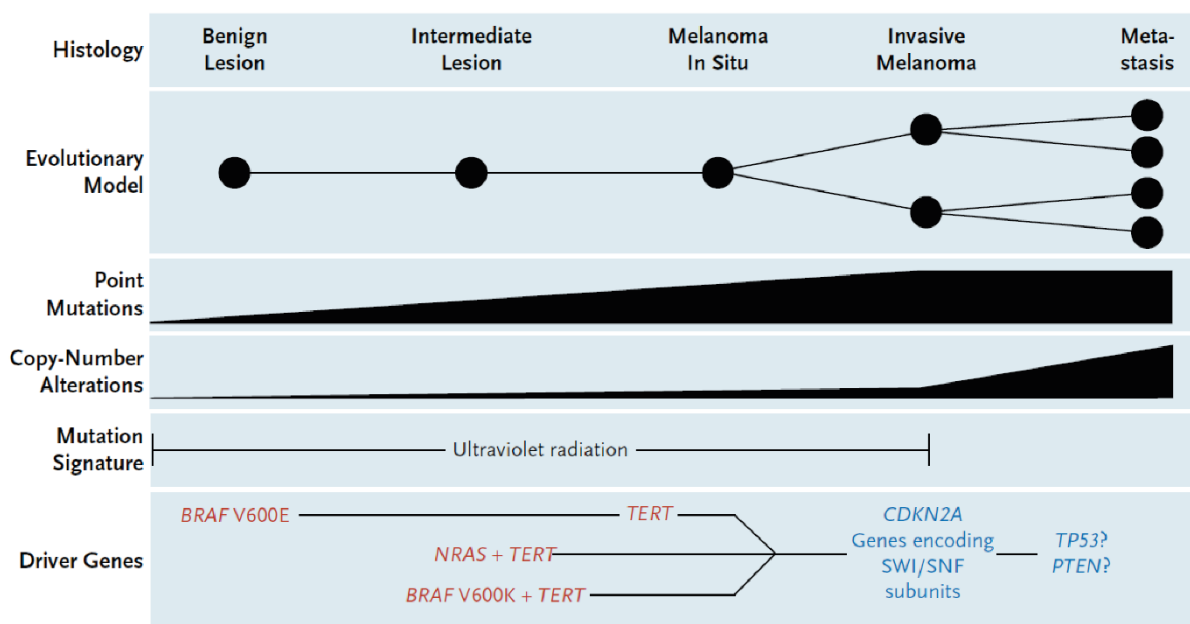


**Figure 1.37 : Progression de la transformation tumorale des mélanocytes**(Gray-Schopfer et al., 2007)

Des travaux récents de séquençage de 37 mélanomes primaires provenant de lésions à différents stades de la pathologie ont permis de définir la succession d'altérations génétiques durant la progression tumorale (Shain et al., 2015). Les auteurs ont pu montrer l'existence de différents sous types de mélanome en fonction de profil mutationnel (**Figure 1.38**). Les lésions bénignes portent majoritairement la mutation *BRAF* V600E alors que d'autres lésions qualifiées d'intermédiaires peuvent également porter cette mutation et sont enrichies en mutation *NRAS*. Ces mutations activent la voie des MAPK impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire. Ensuite, toujours dans les stades précoces de la pathologie, lorsque le mélanome reste localisé, une grande proportion porte la mutation du

promoteur *TERT*. Ce gène code pour une télomérase permettant de maintenir la longueur des télomères. Sa mutation entraîne son activation et bloque l'entrée en sénescence des cellules tumorales. Au début du stade invasif on retrouve ensuite la perte de *CDKN2a* codant pour les suppresseurs de tumeur p16 et p14<sup>ARF</sup>. *PTEN* et *TP53* sont retrouvés mutés seulement dans des stades avancés de mélanome. Ces deux gènes codent pour des protéines essentielles à la régulation du cycle cellulaire.

Ces travaux ont également permis de montrer une signature mutationnelle particulière due aux rayons UV soulignant l'implication majeure de ce facteur dans le développement malin du mélanome.



**Figure I.38 : Modèles proposés pour la progression des mélanomes se développant sur des sites exposés au soleil**

#### I.4.b) Un cancer immunogène

Les études sur le mélanome ont joué un rôle central dans la compréhension des réponses immunitaires anti-tumorales. En effet, plusieurs observations cliniques ont permis de mettre en évidence l'activité du système immunitaire dans le mélanome. Le système immunitaire réagit naturellement au mélanome, c'est la définition d'un cancer immunogène. L'immunogénicité du mélanome se caractérise par :



- Tout d'abord, des antigènes associés aux tumeurs (TAA) sont exprimés par les cellules de mélanome. Ces antigènes reconnus par des Ac et LT sont capables d'induire des réponses immunitaires spécifiques de la tumeur. Il a été montré que le mélanome a un fort taux mutationnel comparé à d'autres tumeurs (Alexandrov et al., 2013) et que ces mutations contribuent à la génération de nouveaux épitopes. Les antigènes de mélanome ont ainsi pu être identifiés rapidement par rapport à des tumeurs développées dans d'autres tissus (Boon, 1996 ; Houghton et al., 2001). Les antigènes associés au mélanome peuvent être catégorisés en différents types (Epping and Bernards, 2006; Fratta et al., 2011; Lupetti et al., 1998):

- les antigènes de différenciation exprimés par des cellules non transformées et malignes mais propre au lignage mélanocytaire : gp100, tyrosinase, Melan-A et TRP-2-INT2 (une protéine dont l'intron 2 est maintenu apparentée à la tyrosinase)
- les antigènes tumoraux exprimés normalement dans les testicules (CTA) et le placenta : MAGE-A1 (melanoma antigen-1), NY-ESO-1 et PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma)
- les antigènes de molécules mutées ou surexprimées : CDK4 et MUM-1

L'ensemble de ces antigènes constitue des cibles potentielles pour les immunothérapies. Les CTA et les molécules mutées ou surexprimées ont été identifiés dans plusieurs types de cancers malins (tumeurs solides et de type hématologique). Ainsi, les résultats de recherche sur ces modèles de mélanome sont potentiellement transférables à d'autres cancers.

- Le mélanome primaire peut régresser spontanément chez le patient. Cette caractéristique a été corrélée avec une réponse immunitaire efficace contre les cellules de mélanome (Valenzano et al, 2010). En effet, un microenvironnement inflammatoire associé avec un important infiltrat lymphocytaire a été observé dans les tumeurs ayant régressées (Wenzel et al., 2005). Cependant, comme détaillé dans la partie I.3, la pression sélective exercée par le système immunitaire entraîne l'évolution des cellules de mélanome vers l'échappement à cette surveillance expliquant la rareté de la régression spontanée des métastases ou de la régression induite par des thérapies (Reiman et al., 2007; Speeckaert et al., 2011).

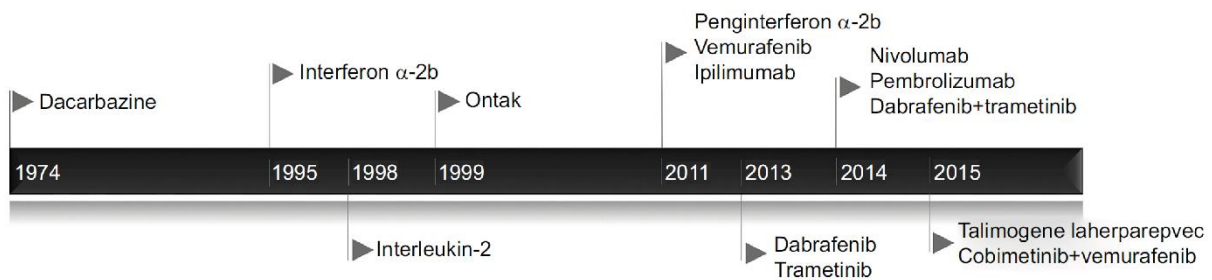
- Un autre signe de réponses anti-tumorales immunitaire est l'observation de vitiligo chez les patients atteints de mélanome. Le vitiligo est une pathologie caractérisée par une hypopigmentation de la peau dont la cause principale serait une réaction autoimmunitaire

(Van den Wijngaard et al., 2001). Or une fréquence importante de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes de mélanome a été observée dans le sang périphérique de patients atteints de mélanome et de vitiligo comparé aux patients atteints de mélanome sans vitiligo (Le Gal et al., 2001). De plus, il a été montré que le développement de vitiligo chez des patients traités par les immunothérapies est un signe de bon pronostic (Boasberg et al., 2006). Ces données suggèrent que le vitiligo chez les patients atteints de mélanome pourrait être une conséquence visible de réponse anti-tumorale spontanée conduisant à une régression de la tumeur.

- Enfin, le mélanome est un des premiers cancers où la présence de lymphocytes infiltrants la tumeur (TIL) a été corrélé avec un bon pronostic (Al-Batran et al., 2005; Clemente et al., 1996). De plus, il a été montré que dans le mélanome, il y a une forte expansion des LT activés contre la tumeur. Ceci est un argument en faveur de l'immunogénicité du mélanome, il déclenche une forte expansion clonale des LT spécifiques de la tumeur (Per thor Straten et al., 1999).

## I.5. Les thérapies contre le mélanome, les immunothérapies et leurs limites

La société Européenne d'oncologie médicale souligne l'importance d'un diagnostic détaillé pour l'établissement d'un stade tumoral et dans certains cas un test de mutation est également requis (Dummer et al., 2015). Les avancées de ces dernières années ont conduit au développement de plusieurs thérapies approuvées par la FDA (US Food and Drug Administration) **Figure I.39**. En fonction des caractéristiques de la tumeur (localisation, stade, profil génétique), les options thérapeutiques peuvent être la résection chirurgicale, la chimiothérapie, la radiothérapie, la thérapie photodynamique, la thérapie ciblée ou l'immunothérapie (Miller et al., 2016).



**Figure I.39 : Thérapies approuvées par la FDA pour le traitement du mélanome.** La dacarbazine fut le premier traitement approuvé. C'est la chimiothérapie utilisée pour le traitement du mélanome. Puis l'IFN  $\alpha$ -2b, l'IL-2, l'ontak ont été approuvés dans les années 1990. Puis entre 2011 et 2015, 10 thérapies ont été validé par la FDA incluant des inhibiteurs sélectifs, des anticorps et des thérapies combinées. Figure extraite de Domingues et al., 2018.

Avant le stade 4 de la pathologie, la chirurgie dès qu'elle est possible est le premier traitement. Pour améliorer la survie des patients, des thérapies adjuvantes supplémentaires telles que la thérapie ciblée et l'immunothérapie sont recommandées (Ven Zeijl et al., 2017). Pour les patients atteints d'une métastase dite solitaire, la métastasectomie est pratiquée. Faiblement indiqué pour le traitement de tumeur primaire, la radiothérapie peut être utile pour le traitement de métastases dans la peau, l'os et le cerveau (Testori et al., 2017). Au stade 4, la thérapie ciblée et l'immunothérapie seront privilégiées et discutées ci-dessous. On retrouve deux types de limites dans les thérapies anti-mélanome : les effets secondaires sont importants duent à un manque de ciblage spécifique de la tumeur, et une efficacité

réduite qui peut résulter d'une résistance aux thérapies utilisées (Li et al., 2015 ; Widakowich et al., 2007).

### **I.5.a) Les thérapies ciblées**

Avant 2011 le principal traitement pour les patients atteints de mélanome métastatique était la chimiothérapie par traitement à la dacarbazine (**Figure I39**). Cependant son efficacité sur la survie des patients restait limitée (Garbe et al. 2016). Aujourd'hui, de nouvelles cibles thérapeutiques ont émergé d'études de profil génétique des mélanocytes et de l'identification de facteurs moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la transformation tumorale des cellules mélanocytaires.

#### **Les inhibiteurs de BRAF**

50% des mélanomes cutanés portent une mutation de *BRAF* (Brose et al., 2002). Des mutations du gène *BRAF* sont associées avec l'activation de la voie de signalisation MAPK entraînant une augmentation de la croissance tumorale. La mutation la plus répandue est au niveau de l'acide aminé 600 (*BRAF*<sup>V600E</sup> ou *BRAF*<sup>V600K</sup>).

Le vemurafenib, un inhibiteur spécifique de BRAF a été validé par la FDA en 2011 (**Figure I.39**) pour le traitement de mélanome métastatique portant ce type de mutation (Livingstone et al., 2014).

Comparé aux chimiothérapies, le vemurafenib améliore les réponses cliniques, la survie sans progression et la survie globale des patients atteints de mélanome métastatique. Des études ont montré qu'une régression tumorale a été observée chez 90% des patients.

Cependant, les réponses cliniques de ces inhibiteurs sont limitées due au développement rapide de multiples mécanismes de résistance tels que des mutations activatrices de *N-RAS* ou de nouvelles mutations de *BRAF*. Ceci a conduit au développement de thérapies combinées qui semblent plus efficace que les monothérapies. Plusieurs essais cliniques sont en cours avec le vemurafenib en monothérapie ou en combinaison avec d'autres types de thérapies. Le dabrafenib et l'encorafenib sont également des inhibiteurs de *BRAF* muté. Ils ont été approuvés plus tard par la FDA et sont aussi en phase d'essais cliniques en combinaisons avec d'autres types de thérapies.

### **D'autres types de thérapies ciblées**

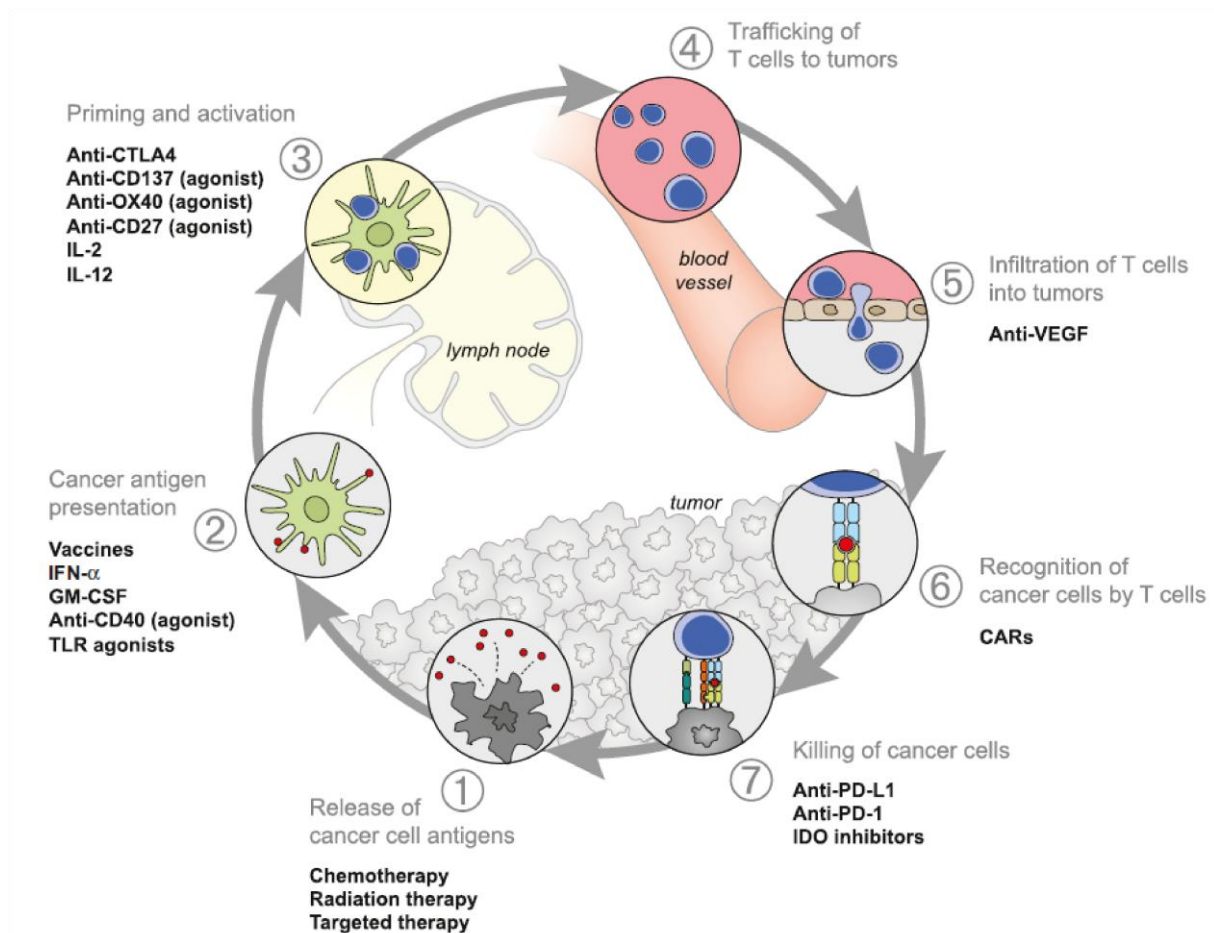
Tous les patients ne portent pas la mutation  $BRAF^{V600E}$  ou  $BRAF^{V600K}$  et de nombreux cas de rechutes ont été observés conduisant au développement d'autres types de thérapies ciblées. Un inhibiteur de MEK1/2 (trametinib), des inhibiteurs de *CKIT* (imatinib), un anticorps neutralisant le VEGF (bevacizumab), des inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR (BKM120), des inhibiteurs de kinase dépendante des cyclines (CDK) (ribociclib, abemaciclib, palbociclib) ont été développés et sont tous dans plusieurs essais cliniques en monothérapie ou associé à d'autres types de thérapies (Domingues et al., 2018).

### **I.5.b) Les immunothérapies**

Différentes stratégies thérapeutiques ont été développées afin de potentialiser la réponse des CTL à différentes étapes de leur cycle d'activation. Le niveau d'action des thérapies est illustré dans la **Figure I.40**. Dans ce chapitre seront retranscrits uniquement l'efficacité des immunothérapies développées ces dernières années contre le mélanome.

L'évaluation de l'efficacité d'un traitement anti-tumorale se fait sur la base de certains critères établis en 2000 et actualisés en 2009 sous l'acronyme RECIST. RECIST est basé sur la mesure de la taille des lésions et se découpe 4 groupes :

- Disparition de toutes les lésions tumorales : réponse complète
- Réduction d'environ 30% de la taille de la tumeur : réponse partielle
- Aucune progression : maladie stable
- Augmentation de minimum 20% de la taille de la tumeur ou du nombre de lésions ou apparition de nouvelles lésions : maladie en progression.



**Figure 1.40 : Les thérapies qui potentialisent le cycle d'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale.** Cette figure illustre l'étape d'action de certaines des thérapies existantes en phase d'essais ou approuvées. Figure extraite de Chen and Mellman, 2013.

## IFN $\alpha$ -2b

Les IFN sont d'importantes cytokines qui possèdent un rôle majeur dans la surveillance anti-tumorale par leurs activités immunomodulatrice, anti-angiogénique et anti-proliférative (Rafique et al., 2015; Sanlorenzo et al., 2017). Des fortes doses d'IFN $\alpha$ -2b ont été approuvées par la FDA en 1995 comme traitement adjuvant pour les mélanomes en rechute de stade IIB/III (Rafique et al., 2015). Dans le mélanome, l'IFN $\alpha$  a un effet immunomodulateur antitumoral en stimulant l'expression du CMHI sur les cellules de mélanomes et immunitaires. Il altère également la prolifération des cellules de mélanome par un effet pro-apoptotique (Roh et al., 2013). Une étude a également montré que l'IFN $\alpha$  adjuvant réduit significativement le risque de récurrence et améliore la survie des patients atteints de mélanome (Ives et al., 2017). Cependant, seulement une minorité de patients

répondent à l'IFN(Aubert et al., 2015). Bien que d'autres thérapies ont émergé ces dernières années, l'IFN persiste en essais cliniques en combinaison avec d'autres immunothérapies et thérapies ciblées.

## **IL-2**

L'IL-2 a été montré pour avoir une activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo*. Ce traitement a ainsi été approuvé par la FDA en 1998 pour le traitement du mélanome métastatique(Krieg et al., 2010). Cependant, une analyse a montré que le traitement IL-2 permet une réponse complète dans 4% des cas, partielle de 12,5% et globale de 19,7%. Une seconde étude sur 8 ans de 270 patients montre également un effet modéré des bénéfices cliniques de ce traitement. Ces effets limités et les importants effets secondaires générés limitent l'utilisation de l'IL-2. Comme l'IFN, l'IL-2 est encore inclus dans des essais cliniques mais en combinaison avec la chimiothérapie, la radiothérapie ou d'autres immunothérapies et les thérapies ciblées(Guida et al., 1996).

## **L'inhibition des Treg**

Le recrutement des Treg fait partie des mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire par la mise en place d'un microenvironnement anti-inflammatoire via l'altération de l'activité des LT effecteurs (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009; Han et al., 2009). Dans le mélanome la présence de Tregs a été suggérée comme de mauvais pronostic(Jacobs et al., 2012). L'ontak, approuvé par la FDA en 1999 est une protéine de fusion entre l'IL-2 et la toxine diphtérique qui permet l'élimination des Tregs exprimant le récepteur à l'IL-2 dans le sang périphérique (Wang et al., 2017). Un essai clinique de phase II de patients atteints de mélanome en stade 4 ont permis de mettre en évidence 16,7% de réponses partielles, dans 5% des cas la maladie est restée stable et 15% de réponses mixtes(Telang et al., 2011). A l'inverse, une autre étude a montré que les patients atteints de mélanome métastatique traités avec de l'ontak n'améliore pas les réponses cliniques, pas de régression de la maladie et pas d'élimination des Tregs n'ont été observé dans cette étude (Attia et al., 2005). Des études plus poussées sont donc nécessaire pour déterminer si des marqueurs prédictifs existent permettant de prédéfinir la nécessité de l'inhibition des Treg chez les patients.

## **L'inhibition de CTLA-4**

L'ipilimumab, approuvé par la FDA pour le traitement de mélanomes avancés en 2011 est un anticorps anti-CTLA-4. Comme précédemment décrit, CTLA-4 est un checkpoint inhibiteur qui interfère avec l'activation des LT et induit une tolérance immunitaire. Les anti-CTLA-4 agissent comme des antagonistes, bloquant l'effet inhibiteur de la molécule, augmentant ainsi l'activation des LT et par conséquent la production de cytokines pro-inflammatoires, l'expansion clonale et l'infiltration de LT (Ribas et al., 2009; Walker and Sansom, 2011). La combinaison de l'IL-2 et ipilimumab n'a pas montré d'amélioration par rapport à l'ipilimumab seul (Weide et al., 2017). L'ipilimumab a été combiné avec le peg-IFN ( $\text{IFN}\alpha$  combiné à une molécule renforçant sa stabilité dans le sang) ou le vaccin avec le peptide gp100 et comparé avec chaque traitement seul. Il s'est avéré plus efficace en monothérapie avec une amélioration de la survie globale de 10 mois (Brohl et al., 2016). L'amélioration de la survie globale du CTLA-4 a été estimée à 6,4 mois (Hodi et al., 2010). Ce traitement a ainsi été le premier de ces 30 dernières années à apporter un réel bénéfice clinique aux patients. Mais les effets secondaires de ce traitement sont majeurs (Batus et al., 2013). Ce traitement peut notamment induire des altérations auto-immunes telles que la dermatite, la colite, l'hépatite, l'endocrinopathie et plus rarement des neurites, plus fréquents à forte dose. Des corticostéroïdes ou autres immunosuppresseurs peuvent permettre de contrôler ces effets secondaires. Des essais cliniques sont en cours pour le combiner avec la chimiothérapie, la radiothérapie ou autres immunothérapies et thérapies ciblées. Le tremelimumab, un autre anti-CTLA-4 est aussi utilisé en clinique en monothérapie et en combinaison avec d'autres immunothérapies (Ribas, 2010).

## **Le blocage de la voie PD-1/PD-L1**

Pour rappel, le récepteur PD-1 se lie à PD-L1 et PD-L2, il agit comme une molécule co-inhibitrice et supprime l'activation des LT. En plus d'être exprimé par les CPA, les ligands sont aussi exprimés sur un grand nombre de tumeurs et de cellules du microenvironnement tumoral en réponse à des stimulus inflammatoires (Cho et al., 2016).

Le nivolumab est un anticorps monoclonal de forte affinité pour PD-1 qui inhibe la liaison du récepteur avec ses ligands (Melero et al., 2013). Le nivolumab a été approuvé par la FDA pour le traitement des patients atteints de mélanome métastatique en 2014 (Raedler, 2015). Le blocage de l'interaction entre PD-1 et ses ligands déclenche des réponses immunitaires et



induit une activité anti-tumorale qui réduit la progression tumorale(Johnson et al., 2015). Le nivolumab semble être plus efficace que les monothérapies ipilimumab avec une survie sans progression de 6,9 mois et 2,9mois(Johnson et al., 2015). La combinaison du nivolumab et ipilimumab a permis d'améliorer la survie sans progression de 11,5mois(Franklin et al., 2017).Le pembrolizumab été validé par la FDA en 2015 pour le traitement de mélanomes avancés et pourrait être le nouveau traitement utilisé pour les mélanomes réfractaires à l'ipilimumab(Robert et al., 2015).

### **La vaccination avec le peptide gp100**

Plusieurs essais cliniques de vaccination ont été testés notamment avec des cellules tumorales irradiées mixées à des adjuvants bactériens. Ces essais se sont avérés d'une efficacité limitée mais encourageante dans le traitement du mélanome (Berd et al., 1990).

L'avantage de la vaccination est l'expression de l'antigène sur une longue durée. Plus récemment, grâce à la compréhension des mécanismes moléculaires de la progression du mélanome et de la reconnaissance immunitaire, des études se sont tournées vers les antigènes spécifiques du mélanome tels que gp100. Gp100 est une glycoprotéine exprimée spécifiquement par les cellules de mélanome (et des mélanocytes) et reconnu par les CTL. Ainsi il a été montré que l'immunisation avec cet antigène peut augmenter la réponse cytotoxique anti-tumorale (Panelli et al., 2000). Cependant, des études précliniques de phase I n'ont pas permis de mettre en évidence des bénéfices cliniques en monothérapie de cette stratégie (2009). Celle-ci a donc été suggérée comme thérapie adjuvante. En effet, la combinaison du vaccin exprimant le peptide gp100 avec l'IL-2 augmente la réponse clinique globale au mélanome et la durée de la survie sans progression de la maladie avec une réponse complète dans 5% des cas(Schwartzentruber et al., 2011).

### **Le transfert adoptif de LT**

Le développement des immunothérapies a également conduit vers l'étude des traitements personnalisés. Comparé aux approches précédemment présentées, le transfert adoptif de LT n'est pas lié à une activation endogène des cellules immunitaires mais à l'amplification exogène d'un grand nombre de LT. Une réponse clinique a été observée dans 50% des patients ayant reçu des fortes doses de TIL amplifiés et activés *ex vivo* avec une rémission complète pour 10% des patients(Dudley et al., 2002). Une étude plus récente de cette

immunothérapie a également montré dans le mélanome métastatique des réponses durables ou une stabilisation de la maladie (Klemen et al., 2017).

Le transfert adoptif de LT se base sur 3 stratégies :

- 1) Récupérer et expandre des TIL provenant de biopsies de mélanome *ex vivo* pour les retransfuser au patient
- 2) Récupérer les LT du sang périphérique des patients, les modifier génétiquement par des vecteurs rétroviraux ou plasmidiques pour induire l'expression de récepteurs antigéniques chimériques (CAR) et de nouveau amplifier ces cellules *ex vivo* pour les transfuser au patient

Les CAR sont composés d'un domaine extracellulaire spécifique d'un antigène, un domaine transmembranaire et un domaine de signalisation intracellulaire (Jackson et al., 2016; Yu et al., 2017). L'enjeu de cette stratégie thérapeutique est de trouver l'antigène qui permettra une réponse anti-tumorale efficace. Dans le cas du mélanome, GD2 est un exemple de molécule fortement exprimé par les cellules de mélanome qui peut être ciblée par les CAR (Merhavi-Shoham et al., 2017).

- 3) Récupérer les LT du sang périphérique des patients, les modifier pour induire l'expression d'un TCR qui reconnaît les antigènes de mélanome avec une forte affinité. De même que précédemment, ces cellules sont amplifiées et transfusées au patient.

Ce type de thérapie implique la capacité des LT à survivre et proliférer sur le long terme indispensable pour l'induction d'une réponse immunitaire (Chang and Pearce, 2016). La modulation du métabolisme des LT a ainsi été suggérée comme une méthode pouvant améliorer le transfert adoptif des LT (Sukumar et al., 2013).

En conclusion, les immunothérapies sont très prometteuses mais nécessitent encore des recherches pour optimiser les limites de chacune d'entre elles. Les solutions aujourd'hui largement envisagées sont l'utilisation de différentes stratégies thérapeutiques simultanément afin de prévenir au mieux la mise en place de résistance par les cellules de mélanome (Krattinger et al., 2019). Une autre approche également envisagée est le ciblage de nouveaux immune checkpoint (Tundo et al., 2019). Enfin, beaucoup de recherches visent aujourd'hui à mettre en évidence des marqueurs prédictifs de l'évolution de la maladie qui

permettraient d'établir le choix de la stratégie thérapeutique à utiliser le plus optimal possible (Gibney et al., 2016; Yan et al., 2018).

### **I.5.c) La SI, nouvelle cible thérapeutique ?**

Des dysfonctions de formation de la SI ont été mise en évidence dans plusieurs pathologies. Parmi elles se trouvent plusieurs immunodéficiences telles que le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), le syndrome de WHIM qui ont été associé à une altération de la stabilité de la SI (Kallikourdis et al., 2015; Khazen et al., 2019). Le même type de conclusion a été établis concernant le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X avec un défaut de formation de SI entre les LT et LB et des synapses lytiques dysfonctionnelles (Ruffo et al.; Schwartzberg et al., 2009). Certaines maladies autoimmunes ont également été associé à des SI altérées telles que la sclérose en plaque et le diabète de type 1 (Schubert et al., 2012). Dans un contexte tumoral, de plus en plus d'études sont publiées à ce sujet. Des défauts de formation de la synapse ont été montrés entre des LT et les cellules tumorales dans la leucémie lymphoïde chronique (CLL) et le lymphome B (Nassef Kadry Naguib Roufaiel et al., 2015; Ramsay et al., 2008, 2009). Les LB aurait un rôle dans l'induction de tolérance des LT naïfs (Bennett et al., 1998; Kabanova et al., 2016; Overstreet et al., 2009) et bloque l'activité cytotoxique des CTL par l'inhibition de l'exocytose des granules lytiques à la SI (Kabanova et al., 2016).

Dans une récente étude, par des techniques d'imagerie à haute résolution en 3 dimensions une équipe a pu analyser la dynamique des SI formées dans le microenvironnement du glioblastome (Díaz et al., 2018). La balance entre la formation de SI stable et la formation de kinapse a été comparé dans des régions histologiques différentes, néoplasique ou non néoplasique, d'échantillons humains de gliome. Un important infiltrat lymphocytaire est observé dans les gliomes de haut grade. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une fréquence plus importante de kinapse dans les régions malignes de la tumeur comparé à la formation de SI. La balance kinapse/SI inverse a été observé dans les régions non lésionnelles. Ces données suggèrent une certaine difficulté des LT à reconnaître l'antigène présentés par les cellules tumorales. Ce déséquilibre de formation de kinapse et SI corrèle avec l'anergie des LT et souligne l'implication de cette structure dans l'efficacité des LT anti-tumoraux.

Au-delà de l'action des inhibiteurs des immune checkpoint sur l'activation des CTL par la SI détaillée précédemment, une étude a récemment montré un rôle direct de PD-1 dans le blocage de la polarisation des granules lytiques des cellules NK (Huang et al., 2018). De façon intéressante les auteurs montrent que la formation de conjugués entre les cellules NK et les cellules cibles n'est pas altérée mais que PD-1/PD-L1 perturbent le mécanisme moléculaire de lyse dirigée des cellules NK.

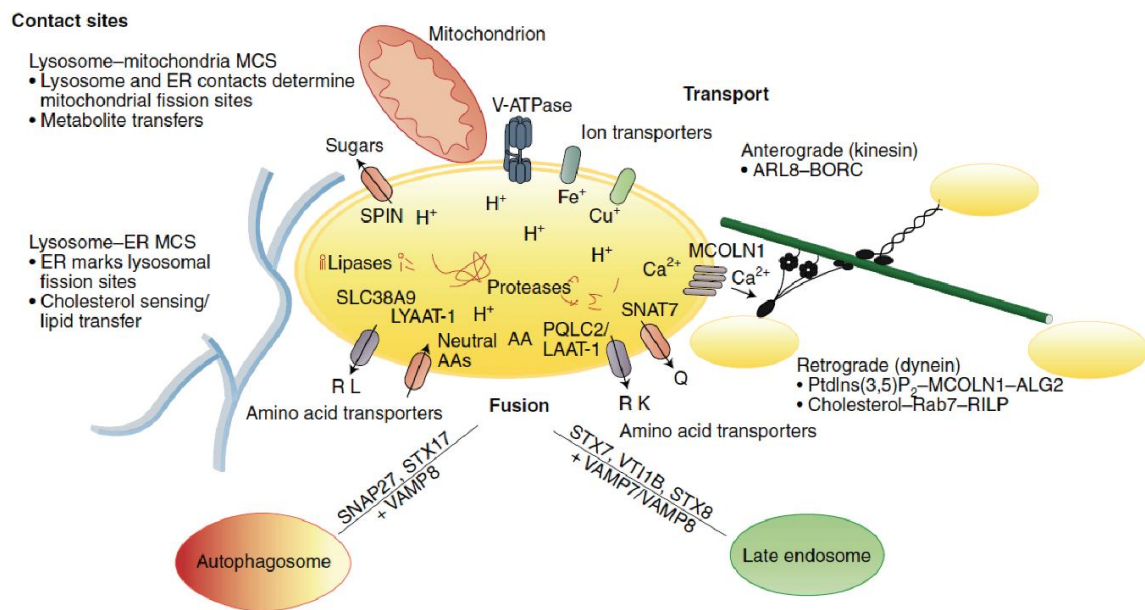
Dans le cadre des immunothérapies, la SI a également été montrée comme essentielle à la prédiction de l'efficacité des CAR-LT. Sur la base de la polarisation des granules lytiques, la distribution des molécules de signalisation à la SI, l'accumulation de F-actine, Xiong *et al.*, ont montré que la capacité cytotoxique de différents CAR-LT spécifiques du même antigène est liée avec la qualité de la SI. Ces données obtenues *in vitro* corrélaient avec l'efficacité des CAR-LT *in vivo* dans des modèles murins de xénogreffes (Xiong et al., 2018).

Enfin, Khazen *et al.*, ont montré que face à des CTL activés, les cellules de mélanome sont capables de mettre en place des mécanismes de résistance durant la formation de la synapse lytique (Khazen et al., 2016). En effet, cette étude a permis de mettre en évidence la résistance des cellules de mélanome à l'attaque des CTL par une exposition de leurs lysosomes à la synapse lytique. Ceci entraîne un défaut de perforation des cellules tumorales conduisant à un défaut d'entrée des granzymes et donc de l'induction d'apoptose des cellules cibles. De plus, ils ont pu montrer que l'altération de l'exposition des lysosomes ou des protéases lysosomales des cellules tumorales augmente leur sensibilité à l'attaque des CTL. Cette étude révèle un nouveau mécanisme de résistance des cellules de mélanome basé sur une contre attaque du contenu des granules lytiques des CTL par le contenu du compartiment lysosomal des cellules de mélanome. Cette activité d'exocytose partagée par les cellules tumorales et les CTL révèle non pas un défaut de formation de la synapse lytique mais de sa fonction d'induction de la mort de leurs cellules cibles par une attaque localisée.

## **I.6. Les lysosomes et les mécanismes de réparation membranaire**

### **I.6. a) La biologie des lysosomes et des mélanosomes**

Les lysosomes sont des organites cellulaires initialement décrits pour leur fonction catalytique caractérisée par la présence d'environ 60 protéases, lipases, nucléases et autres hydrolases présentes pour détruire les complexes macromoléculaires présents dans ce compartiment cellulaire(Perera and Zoncu, 2016; Settembre et al., 2013). Les métabolites produits dans ce compartiment sont multiples et utilisés par la cellule ou stockés (Abu-Remaileh et al., 2017). La fonction catalytique des lysosomes est ainsi essentielle au métabolisme cellulaire. Ces hydrolases nécessitent un pH acide d'environ 4,5 établis et maintenu par la pompe à protons  $H^+$ -ATPase vacuolaire (v-ATPase)(Zhao et al., 2015). Les lysosomes contiennent également des ions, notamment des ions  $Ca^{2+}$  dont la régulation est essentielle au processus de fusion avec d'autres types de vésicules(Luzio et al., 2007). La détection de nutriments et la transmission de signaux métaboliques constitue une seconde fonction majeure attribuée aux lysosomes. En effet, il a été montré que la protéine kinase mTORC1 est recrutée et activée au niveau des lysosomes. Cette protéine est activée en présence de facteurs de croissance et de nutriments(Perera and Zoncu, 2016; Saxton and Sabatini, 2017).Sa fonction principale étant la régulation de la croissance cellulaire. La biologie des lysosomes est complexe et a été résumé dans la **Figure I.41**.



**Figure I.41 : Biologie des lysosomes.** Les lysosomes répondent de façon très dynamique aux différents processus cellulaires. La v-ATPase acidifie les lysosomes et participe à la détection des nutriments. Des transporteurs d'acides aminés tels que SLC38A9, SLC36A1 (ou LYAAT-1), LAAT-1 (Lysosomal amino acid transporter 1 homologue ou PQLC2) et SNAT7 (ou SLC38A7), des canaux de sucres tels que SPIN et des canaux ioniques tels que TRPML1 (ou mucopilin 1 et MCOLN1) permettent de maintenir le stock d'acides aminés, de sucres et d'ions dans le lysosome. Les lysosomes communiquent par des sites de contact membranaires physiques (MCS) avec des organelles tels que les mitochondries et le reticulum endoplasmique. Ces sites de contact participent à l'échange de nutriments. Le lysosome appartient à la voie de maturation des endosomes. Il fusionne avec les endosomes tardifs par des protéines SNARE telles que la syntaxin-7 (STX7), STX8 et VAMP7 ou VAMP8. Les lysosomes jouent également un rôle critique dans l'autophagie par la fusion avec les autophagosomes avec des protéines SNARE similaires incluant SNAP27, STX17 et VAMP8. Les lysosomes sont transportés entre les régions péri-nucléaires et la périphérie cellulaire par les microtubules. Le complexe ARL8-BORC stimule le transport des lysosomes vers les extrémités positives des microtubules alors que le complexe Rab7-RILP ou MCOLN1-ALG2 stimule le transport vers les extrémités négatives. Figure extraite de Lawrence and Zoncu, 2019.

Une propriété aujourd'hui bien décrite des lysosomes est leur capacité à être sécrétée. Ce mécanisme de sécrétion des lysosomes dit « conventionnels » a été montré comme impliqué dans les mécanismes de réparation membranaire (détaillés ci-dessous). Cependant, certains types cellulaires possèdent des lysosomes spécialisés pour leur fonction de sécrétion régulés par des mécanismes moléculaires précis. Dans ces types cellulaires, les lysosomes contiennent des protéines destinées à être sécrétée en plus des hydrolases nécessaires au maintien du métabolisme de la cellule. Ces lysosomes spécialisés sont appelés « lysosomes sécrétoires » ou « organites associés aux lysosomes ». Parmi les

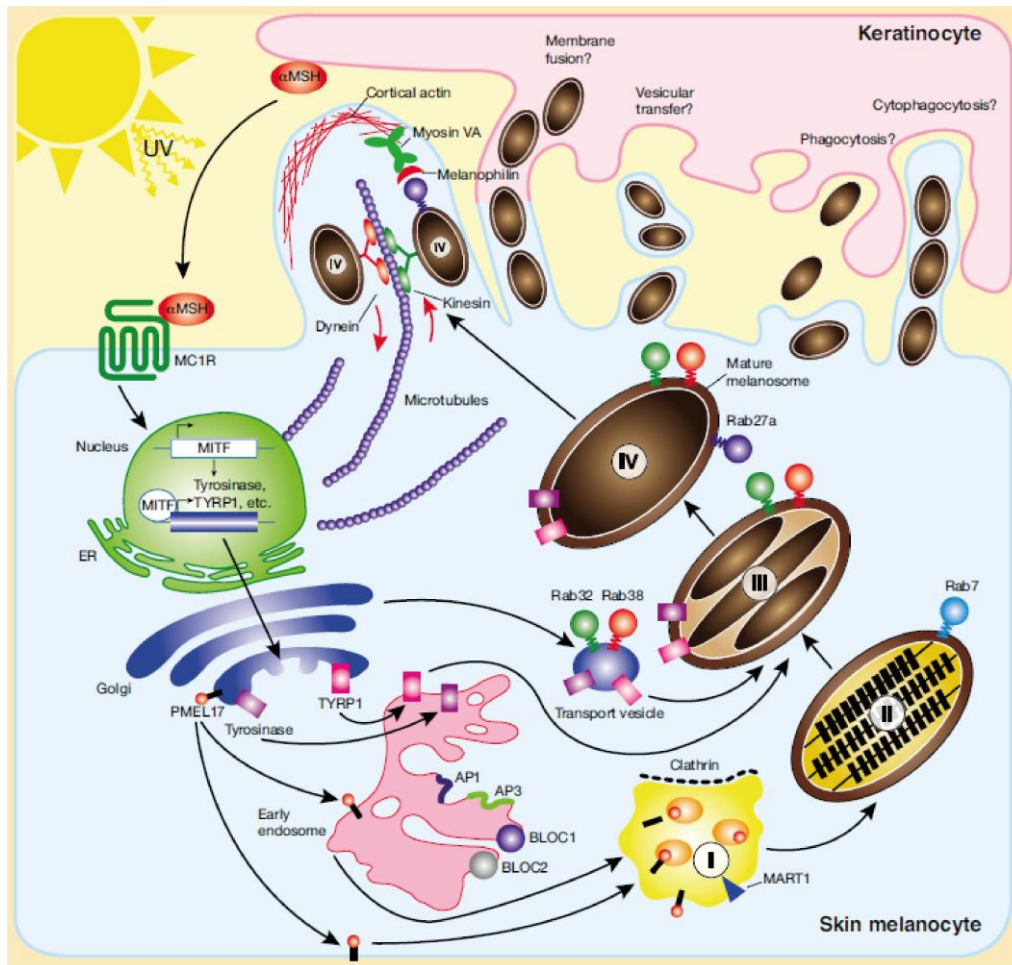
cellules qui possèdent ce type de vésicules, on retrouve les CTL (dont la biogénèse des granules lytiques a été précédemment détaillée) et les mélanocytes.

Les mélanocytes sont en effet caractérisés par leur fonction principale : la sécrétion de la mélanine. Ce mécanisme passe par des vésicules spécialisées appelés les mélanosomes.

Un modèle de biogénèse des mélanosomes est la formation d'une vésicule à partir du RE qui reçoit les enzymes nécessaires à la production de mélanine par le réseau trans-golgien (Jimbow et al., 1997). Les mélanosomes immatures vont subir alors une étape de maturation de 4 stades permettant la génération de mélanosomes fortement chargés en mélanine. Les mélanosomes sont ainsi transférés aux cellules adjacentes, les kératinocytes, par 3 potentiels mécanismes : la cytophagocytose, la fusion membranaire ou le transfert vésiculaire (**Figure I.42**) (Wu and Hammer, 2014).

De façon intéressante, les mélanosomes présentent des propriétés similaires aux lysosomes. Ils sont, comme les lysosomes, caractérisés par un pH luminal acide mais les acteurs moléculaires impliqués dans leur sécrétion semblent relativement spécifiques à ce compartiment cellulaire. En effet, une combinaison d'approches génétiques a permis de montrer que la GTPase Rab27a et sa protéine effectrice la mélanophiline (Mlph ou Slac2a ou exophilin 3) se lie à la myosine 5A (MYO5A). Ce complexe tripartite permet l'association des mélanosomes avec l'actine corticale dans les dendrites des mélanocytes (Hammer and Wu, 2002; Seabra and Coudrier, 2004).

La mélanogénèse est induite suite à des irradiations UV. L'hormone  $\alpha$ -MSH est sécrétée par les kératinocytes et active le récepteur à la mélanocortine 1 à la membrane plasmique des mélanocytes. Ceci déclenche une signalisation qui conduit à l'expression du facteur de transcription MITF (Microphthalmia-associated transcription factor), un régulateur majeur de la fonction des mélanocytes et de la mélanomagenèse (Garcia-Borrón et al., 2005; Vance and Goding, 2004). L'activation de MITF permet l'expression de gènes impliqués dans la survie des mélanocytes tel que *Cdk2* (cyclin-dependent kinase 2), leur différenciation et l'apoptose tels que *Bcl2* et *Hif1a* mais aussi dans la production des mélanosomes tels que *Tyrp1* et *Mlana* (ou MART1) (Levy et al., 2006).



**Figure I.42 : Biogénèse et transport des mélanosomes.**

L'étude de la biogénèse et des fonctions des mélanosomes ont permis d'une part des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes de sécrétion de ce type d'organites associés aux lysosomes. En effet, les mélanocytes partagent des mécanismes de sécrétion avec les CTL comme le montre l'étude de maladies génétiques caractérisées par des défauts de sécrétion de ces 2 types cellulaires (Enders et al., 2006; zur Stadt et al., 2009). D'autre part, ce domaine de recherche est également essentiel dans l'étude du mélanome. En effet, les thérapies en développement et notamment les immunothérapies se basent sur l'optimisation de l'activité des LT anti-tumoraux spécifiques d'antigènes de mélanome. Or ces antigènes sont majoritairement issus des propriétés intrinsèques aux mélanocytes qui se regroupent en une fonction principale qui est la production de mélanosome. De plus, plusieurs facteurs essentiels à la production des mélanosomes, tels que MITF ou SLC7A11, ont été impliqués dans la mélanomagenèse et s'avère donc être des cibles potentielles spécifiques du mélanome (Galván et al., 2019; Levy et al., 2006; Moon et al., 2017).

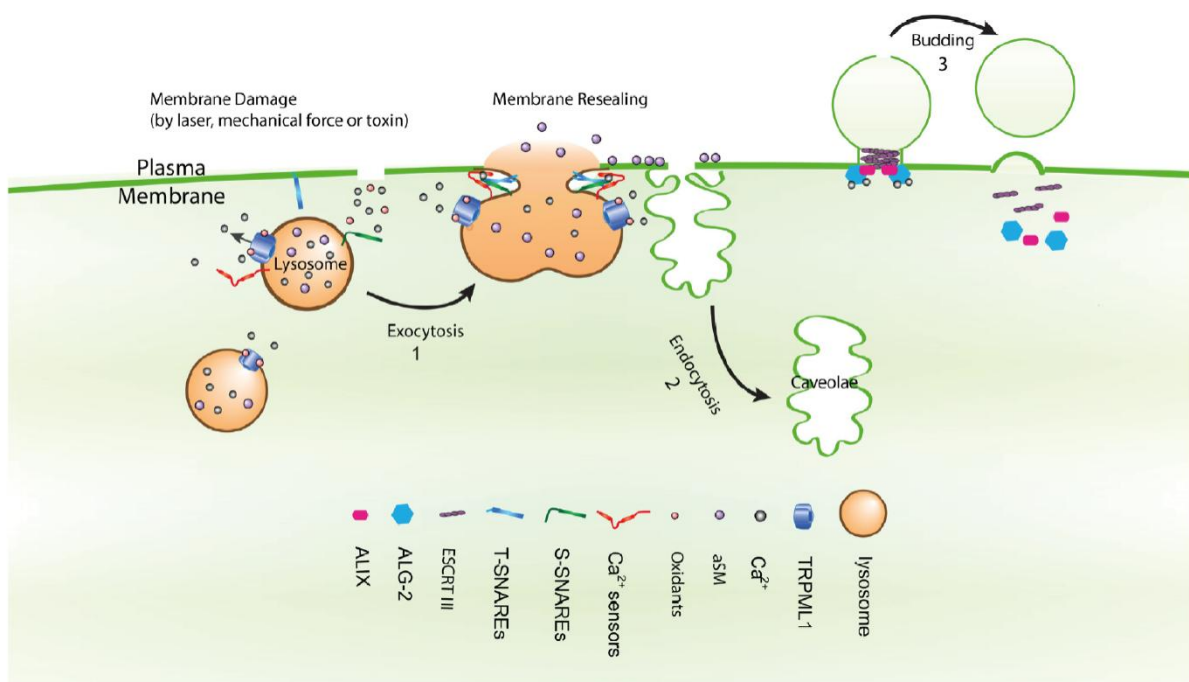


## **I.6. b) Rôle des lysosomes dans la réparation des dommages membranaires**

Des perturbations de la membrane plasmique peuvent être observées en conditions physiologiques dans des tissus mécaniquement actifs tels que l'épithélium qui recouvre notre corps, l'endothélium qui tapisse nos vaisseaux sanguins et la barrière épithéliale de l'appareil intestinal (McNeil, 1993). Les ruptures sont particulièrement fréquentes également dans les cellules musculaires qui peuvent être soumises à diverses forces trop élevées (McNeil and Khakee, 1992). Certaines pathologies humaines sont également caractérisées par des dommages membranaires. Les voies de réparation membranaire s'avèrent ainsi être d'importantes potentielles cibles thérapeutiques. On retrouve notamment les dystrophies musculaires dans lesquelles la fréquence de dommages membranaires déclenchés par les contractions musculaires peut être très importante. Enfin, des dommages peuvent également être causés par des infections via des toxines bactériennes (PFT : Pore Forming Toxins). Ces PFT permettent d'induire la lyse des cellules immunitaires mais la formation de pores sert également à l'entrée d'autres facteurs virulents ou de nutriments nécessaires à la bactérie.

On distingue 3 mécanismes de réparation membranaire (**Figure I.43**) :

- Le modèle « lipid-patch » : des vésicules intracellulaires fusionnent entre elles pour former une macrovésicule (un « patch ») qui fusionne avec la membrane plasmique pour réparer les lésions membranaires. Parmi ces vésicules on retrouve principalement des lysosomes (McNeil et al., 2000; Reddy et al., 2001).
- Le modèle d'endocytose (« endocytic removal ») : les lésions membranaires sont réparées par endocytose (Andrews et al., 2014; Idone et al., 2008a, 2008b). Lors du dommage des aSMase sont sécrétées dans l'espace extracellulaire par l'exposition lysosomale. Ces protéines permettent l'hydrolyse des sphingomyélines qui déclenche une invagination de la membrane (Tam et al., 2010).
- Le modèle de formation de macrovésicules (« macro-vesicle shedding ») : la membrane endommagée forme une vésicule relarguée dans le milieu extracellulaire (Babiychuk et al., 2011). Ce processus nécessite l'assemblage de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Jimenez et al., 2014).



**Figure I.43 : Les trois modèles de réparation membranaire. (1)** Dans le modèle « lipid patch » TRPML1, Syt-VII, dysferline et les protéines SNARE participent à la réparation membranaire. Le dommage membranaire entraîne une entrée de  $Ca^{2+}$  qui stimule le relargage de  $Ca^{2+}$  des lysosomes et active la Syt-VII et d'autres senseurs calciques. Ceci déclenche l'exocytose des lysosomes permettant de réparer le dommage. **(2)** Dans le modèle d'endocytose, « endocytic removal », l'exocytose des lysosomes entraîne le relargage de  $\alpha$ 5Mase qui catalyse les rapides lésions dépendante des céramides par une endocytose clathrine dépendante. **(3)** Dans le modèle « macro vesicle shedding », l'entrée de  $Ca^{2+}$  déclenche le recrutement de la protéine ALG-2 au niveau du dommage. L'accumulation d'ALG-2 facilite l'assemblage de la protéine ALIX et ESCRT III entraînant la formation d'une vésicule puis un clivage du dommage. Figure extraite de Cheng et al., 2015.

Les lysosomes ont été décrits comme un constituant du premier modèle (**Figure I.43**). La sécrétion lysosomale est  $Ca^{2+}$ -dépendante et implique les acteurs moléculaires suivant : la Synaptotagmin VII (une protéine activée par le  $Ca^{2+}$ ) et les protéines SNARE VAMP7, SNAP-23 et la syntaxin 4 (Rao et al., 2004).

Une étude a montré que la perforine peut déclencher des mécanismes de réparation membranaire qui permettrait d'endocyter la perforine pour favoriser l'induction de l'apoptose par rapport à une nécrose. Ceci permettant alors de limiter la réponse inflammatoire déclenchée par les signaux de mort en cas de nécrose (Keefe et al., 2005). Ces auteurs ont plus tard mis en évidence l'implication de la voie d'endocytose dans ce mécanisme dépendant de la clathrine et de la dynamine (Thiery et al., 2010). Ces données corréleront avec les modèles existants de perforation de la cellule cible à la membrane plasmique ou dans des vésicules intracellulaires précédemment détaillés dans la partie I.2b.

## **I.6. b) Protection des CTL de leur propre perforine**

Les mécanismes de résistance des CTL à leur propre perforine ne sont pas encore bien caractérisés. Mais ce mécanisme est essentiel car sans cette résistance il serait impossible pour un CTL de tuer plusieurs cellules cibles (Bertrand et al., 2013; Lopez et al., 2012) car un organisme infecté devrait générer au moins autant de CTL que de cellules infectées si le déclenchement de la lyse des cellules cibles déclenchaient la lyse des CTL. Cependant, les CTL ne sont pas résistants de façon intrinsèque à leur propre granule : les CTL sont tués quand ils présentent leur propre peptide sur des molécules de CMHI (Lopez et al., 2013b). Plusieurs mécanismes de protection ont ainsi été suggérés.

Tout d'abord, après la dégranulation, il a été montré que la surface des cellules NK (tout comme les CTL) est recouverte de LAMP1 (ou CD107a) protégeant les cellules contre leur propre perforine qui vient d'être relarguée (Cohnen et al., 2013).

Un autre mécanisme a été proposé basé sur la dégradation de la perforine par les CTL. En effet, il est possible que plusieurs facteurs soient impliqués dans la protection des CTL de leur propre suicide, le groupe de Henkart a montré que la perforine est un substrat de la cathepsine B exposée par les CTL (Balaji et al., 2002). Ces données ont été contreversées par une équipe qui a montré que la survie des CTL de souris cathepsine B déficientes après attaque d'une cellule cible est similaire aux CTL non déficients pour la cathepsine B (Baran et al., 2006).

Enfin, il a été montré que les CTL expriment fortement un inhibiteur de granzyme B qui est l'inhibiteur de sérine protéase B9 (serpin B9) (Zhang et al., 2006, ref à ajouter à la main). Une étude de déficience de cette protéine a montré que les CTL des souris KO pour la serpin B9 meurent plus rapidement lors d'une réponse à une infection comparé aux souris non déficientes (Zhang et al., 2006). Ces données suggèrent que les CTL ont un réservoir de serpin B9 qui pourrait être épuisé durant une attaque immunitaire prolongée, les CTL pourraient donc avoir une protection que limitée contre perforine et granzymes durant une attaque.

L'ensemble de ces résultats suggèrent l'implication du compartiment lysosomal et des granules lytiques dans la protection des CTL de leur propre mécanisme de lyse.

## II. OBJECTIFS DE THESE

### **Contexte :**

La signalisation calcique est un régulateur clé de la biologie cellulaire, impliqué dans le fonctionnement de nombreux systèmes biologiques, notamment le système immunitaire. Dans les lymphocytes T, la signalisation du  $\text{Ca}^{2+}$  induite par le TCR est cruciale pour la mise en place de plusieurs réponses clés, notamment l'adhésion cellulaire (Lomakina and Waugh, 2010), la régulation des enzymes de signalisation (Pfeifhofer-Obermair et al., 2012), la réorganisation du cytosquelette d'actine (Dushek et al., 2008), la translocation nucléaire des facteurs de transcription (Hogan, 2017) et la sécrétion de granules lytiques par les cellules tueuses (Lyubchenko et al., 2001). Une caractéristique majeure de la signalisation calcique dans les lymphocytes T est la régulation fine de leurs fonctions effectrices par la durée du signal (qui dépend de la stabilité des contacts avec les cellules présentatrices d'antigène). Il est en effet bien établi que dans les lymphocytes T stimulés par un antigène, une synapse immunologique (SI) prolongée ou séquentielle et une signalisation soutenue de  $\text{Ca}^{2+}$  sont nécessaires à la translocation de N-FAT dans le noyau des lymphocytes T conduisant à la transcription des gènes codant pour différentes cytokines (Faroudi et al., 2003b; Gunzer et al.; Valitutti, 1995). La signalisation calcique dans les lymphocytes T peut également avoir des conséquences fonctionnelles rapides comme la sécrétion de granules lytiques qui se produit quelques secondes après l'engagement du TCR. Bien que la signalisation calcique joue un rôle clé dans la fonction des lymphocytes T et lors de l'attaque des CTL, le rôle de cette voie de signalisation dans les cellules cibles après l'attaque des CTL reste à élucider.

### **Hypothèse de travail et objectifs :**

Dans une étude récente, nous avons montré que les cellules de mélanome se défendent de l'attaque des CTL par la sécrétion de leurs vésicules lysosomales/endosomales tardives (LLE) entraînant une dégradation de la perforine (Khazen et al., 2016). Dans la présente étude, nous nous sommes concentrés sur les signaux qui déclenchent la défense des cellules du mélanome à la synapse lytique. La sécrétion des granules lytiques par les CTL est extrêmement rapide, nous avons cherché à savoir si une signalisation pouvait être produite du côté des cellules de mélanome de la synapse lytique rapidement après l'attaque CTL.

Les travaux de recherche décrits dans mon manuscrit de thèse visent à identifier les mécanismes moléculaires induisant la sécrétion remarquablement rapide de LLE par les cellules de mélanome au niveau de la synapse lytique suite à l'attaque des CTL.

Notre plan expérimental s'articule autour des quatre axes suivants :

- I) Mise en place d'une nouvelle méthode simple permettant d'étudier la fonctionnalité de sécrétion des granules lytiques dans les CTL et l'efficacité des cellules cibles à mettre en place des mécanismes de réparation membranaire dans un même test (L. Filali et al. Numéro de dépôt du brevet : EP1830306576.2).
- II) Définir l'événement moléculaire déclencheur du recyclage membranaire réparateur des cellules de mélanome.
- III) Définir la voie de signalisation impliquée dans la réparation membranaire/sécrétion de lysosomes. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur la signalisation calcique puisque cette voie joue un rôle clé dans le processus de réparation membranaire déclenché par des lésions physiques (Cheng et al., 2015).
- IV) étudier l'implication la voie  $\text{Ca}^{2+}$ /synaptotagmine VII dans la résistance des cellules mélanomes à l'attaque CTL

Nos résultats ont permis de mettre en évidence que la rapidité et la localisation synaptique de l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  font de cette voie de signalisation un signal d'alerte idéal pour la mise en place de mécanismes de défense rapides dans les cellules tumorales après l'attaque des CTL. Il permet de redéfinir le rôle de la signalisation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le paradigme de la confrontation CTL/cellules cibles et d'envisager l'étude de cette voie de signalisation comme cible potentielle de l'immunothérapie.

### **III. RESULTATS**

#### **Partie 1 :**

**« Rapid calcium entry at the lytic synapse  
protects melanoma cells from CTL attack »**

## **Rapid calcium entry at the lytic synapse protects melanoma cells from CTL attack**

Liza Filali<sup>1</sup>, Marie-Pierre Puissegur<sup>1</sup>, Roxana Khazen<sup>1,2</sup>, Astrid Canivet<sup>3</sup>, Sabina Müller<sup>1</sup> and Salvatore Valitutti<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse III-Paul Sabatier, 31057 Toulouse, France. Team: Molecular dynamics of lymphocyte interaction, « Equipe labellisée Ligue Nationale contre le Cancer 2018 »

<sup>2</sup>Present address Dynamics of Immune Responses Unit, Institute Pasteur of Paris, 75015 Paris

<sup>3</sup>INSERM, UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, 31024 Toulouse, France

<sup>4</sup>Department of Pathology, Institut Universitaire du Cancer-Oncopole de Toulouse, 31059 Toulouse, France.

\*Corresponding author: [salvatore.valitutti@inserm.fr](mailto:salvatore.valitutti@inserm.fr)

## **Abstract**

It is well established that  $\text{Ca}^{2+}$  signaling plays a key role in lytic granule secretion by cytotoxic immune cells. Yet, whether this signaling pathway also plays a role on the target cell side of the lytic synapse, remains to be elucidated.

Here we show that perforin-mediated pore formation triggers a localized  $\text{Ca}^{2+}$  entry in melanoma cells which is followed by a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane reparative turnover at the lytic synapse. Remarkably, reparative responses swiftly occur upon early lytic granule secretion and precede CTL microtubule organizing center repolarization in a substantial fraction of melanoma/CTL conjugates.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent reparative responses are protective since inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ /synaptotagmin VII pathway results in increased sensitivity to CTL attack.

Our results show that melanoma cells adapted  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane repair mechanisms for synaptic resistance to perforin-mediated CTL attack. They reveal an unpredicted signaling role of  $\text{Ca}^{2+}$  pathway in target cells that counteracts the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent killer cell effector function.



## Introduction

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) play a key role in the immune response against virally infected and tumor cells via the rapid secretion of lytic molecules, such as perforin and granzymes, within specialized secretory areas named lytic synapses<sup>1-6</sup>. Perforin-mediated pore formation allows the entry of granzyme B (GrzB) and of other serine proteases into the target cells. This molecular delivery elicits the apoptotic process<sup>7,8</sup>.

CTL cytotoxic responses are extremely sensitive since they can be triggered by a very small number of specific peptide-MHC (pMHC) complexes displayed on the target cell surface<sup>3,9-11</sup>. Upon TCR engagement with pMHC, TCR-mediated signaling induces cytoskeletal remodeling leading to microtubule organizing center (MTOC) and lytic granule polarization toward the lytic synapse, thus defining the directional release of cytotoxic factors<sup>12-15</sup>. In addition, human CTL also employ a swift mechanism of lytic granule secretion (occurring within seconds after TCR engagement) that is uncoupled from MTOC re-polarization and allows CTL to behave as multiple killers by annihilating several targets encountered simultaneously<sup>4</sup>.

Because of their remarkable ability to kill, CTL are at the heart of therapeutic strategies aiming at improving anti-tumor immune responses. Yet, the efficacy of natural and therapeutically induced CTL response against tumors is limited, for two main reasons. First, several resistance mechanisms are deployed in the tumor micro-environment to limit the development of an anti-tumor immune response (and to obstacle the access of immune cells to the tumor<sup>16,17</sup>). Second several lines of evidence indicate that intrinsic resistance mechanisms of target cells limit the ability of CTL to eradicate tumors<sup>18</sup>.

Our hypothesis is that the limited efficacy of CTL in fighting against tumors can be, at least in part, the result of an unfavorable balance between CTL ability to deliver lytic components into the synaptic cleft and intrinsic tumor cell resistance to perforin-mediated cytotoxicity. In

a recent study, we showed that melanoma cells defend themselves from CTL attack by secreting of their lysosomal/late endosomal (LLE) vesicles leading to perforin degradation<sup>18</sup>.

In this study we investigated the signals that trigger the defense of melanoma cells at the lytic synapse. Since CTL lytic granule secretion is extremely rapid, we investigated whether signaling might occur on the melanoma cell side of the lytic synapse within very short time after CTL attack.

We show that melanoma cells undergo a localized  $\text{Ca}^{2+}$  entry that is followed by a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane reparative turnover at contact sites with cognate CTL. Reparative responses are triggered by perforin-mediated pore formation and are very rapid. A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exposure of  $\text{CD107a}^+$  LLE vesicles at the lytic synapse can indeed be detected within minutes after CTL attack and precede CTL MTOC repolarization. Finally, blocking the  $\text{Ca}^{2+}$ /synaptotagmin VII pathway, limits melanoma cell resistance to CTL attack.

Taken together, our results show that the first minutes of cell-cell contacts are critical to determine the outcome of CTL/melanoma cell interaction. They reveal that perforin-mediated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase is a novel signaling pathway triggered at the lytic synapse that shapes melanoma cell responses to cytotoxic attack.

## Results

### *Accelerated plasma membrane turnover on the two sides of the lytic synapse*

Using single cell analyses based on time-lapse confocal laser scanning microscopy and total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy we have previously shown that human CTL exhibit a remarkable rapidity in lytic granule secretion that allows them to deliver lethal hits to multiple target cells within a short time frame<sup>19</sup>. We also showed that melanoma cells are resistant to perforin-mediated cytotoxicity and defend themselves from CTL attack<sup>18</sup>. To investigate rapid attack/defense events in a large number of CTL/melanoma cell conjugates we developed a FACS-based method allowing a quantitative assessment of both CTL lytic granule secretion and melanoma cell synaptic defense (L. Filali et al. filed patent application; priority patent application number: EP18306576.2).

To this end, FM1-43, a fluorescent lipophilic dye that rapidly intercalates into membrane lipid bilayer during membrane turnover<sup>20</sup> was added to culture medium during CTL/tumor cell interaction. FM1-43 fluorescence was measured, in the two gated cell populations, by FACS analysis at different time points after conjugate formation. Results presented in Figure 1 were obtained by measuring in the same samples melanoma cell and CTL FM1-43 uptake (gating strategy is described in Supplementary Figure 1). We initially performed this analysis on the metastatic melanoma cell line D10 that we have previously characterized in detail for its capacity to fully activate CTL clones when pulsed with antigenic peptides, while being resistant to CTL-mediated cytotoxicity<sup>18,19</sup>.

In the absence of the antigenic peptide, both CTL and D10 cells underwent a basal uptake of FM1-43. However, basal FM1-43 uptake was more pronounced in D10 cells indicating that they display an active basal membrane turnover (Fig.1a-b). Upon conjugation with CTL peptide-pulsed melanoma cells underwent a significant increase in the rate of FM1-43 uptake.

(Fig. 1a and b). Gating on CTL revealed that FM1-43 uptake was rapidly boosted in a significant fraction of these cells interacting with cognate melanoma cells (Fig. 1a and c).

Similar results were obtained when 3 additional melanoma cell lines were analyzed for their capacity to uptake FM1-43 and to activate CTL lytic granule secretion (Fig. 1d and e).

These results indicate that FM1-43 incorporation is a sensitive and rapid method to detect and quantify membrane turnover in melanoma cells and, at the same time, to monitor CTL activation.

To verify whether FM1-43 uptake in CTL can serve as a parameter of lytic granule secretion, CTL were conjugated with D10 cells pulsed with increasing concentrations of antigenic peptide. FM1-43 uptake was measured in parallel with CD107a exposure on CTL surface (a well-accepted readout for CTL lytic granule secretion<sup>21</sup>). This analysis showed that the percentage of CTL undergoing surface expression of CD107a and the percentage of CTL enhancing FM1-43 uptake increased in parallel, at all time points, (Supplementary Fig 2). Moreover, FM1-43 uptake was even more rapid (detected earlier) and more sensitive (detected at lower antigenic concentrations) when compared to the gold standard method based on measuring CD107a exposure (Supplementary Fig 2).

Taken together, the above results show that plasma membrane turnover of CTL and melanoma cells is boosted upon cognate synapse formation and can be monitored at the cell population level by FACS analysis.

#### *Membrane turnover initiates at the CTL/melanoma cell lytic synapse*

To define whether or not, active membrane turnover starts at the lytic synapse, we investigated lipophilic dye uptake at the single cell level using time-lapse spinning disk microscopy. To this end, T cells were pre-loaded with PKH-67 (a membrane dye allowing to define the borders between CTL and melanoma cell plasma membranes) before interaction

with cognate D10 cells. FM4-64 (a dye similar to FM1-43, but with a different emission wavelength not overlapping with that of PKH-67) was added at the beginning of the time-lapse acquisition and kept in culture through the assay.

Several CTL/melanoma cell conjugates were randomly analyzed in different movies and the two cells were investigated for their capacity to incorporate FM4-64 at the lytic synapse. Staining with PKH-67 allowed to define the limits of the two cells and to spot the synaptic area. As shown in Fig. 2 and Movie 1, synaptic FM4-64 uptake rapidly increased within the synaptic area after cell-cell encounter as shown by the distribution profile of red FM4-64 fluorescence and of green PKH-67 fluorescence.

It is interesting to note that the CTL presented in Fig. 2c and Movie 2 is forming two simultaneous lytic synapses with two melanoma cells in both synapses a dramatic increase in membrane turnover was observed.

The above results complement those obtained at the population level and illustrate, at the single cell level, that an active membrane turnover initiates at the CTL/melanoma lytic synapse.

#### *Perforin-mediated pore formation triggers $Ca^{2+}$ -dependent synaptic reparative membrane turnover in melanoma cells*

Having observed that melanoma cells undergo an increased membrane turnover when attacked by CTL, we investigated whether this turnover might be part of a reparative process triggered by CTL lytic attack. To address this point, we investigated whether membrane turnover was the direct consequence of melanoma cells membrane damage due to perforin release by CTL. Thus, we monitored FM1-43 uptake in D10 cells interacting with CTL unable to kill via the perforin pathway.

In a first step, we employed a pharmacological approach to inhibit lytic granule-mediated cytotoxicity. CTL were pretreated with 40  $\mu$ M monensin, a carboxylic ionophore specific for monovalent cations that elevates vacuolar pH<sup>18,22</sup>. As previously described for various treatments known to interfere with lytic granule pH<sup>23</sup>, monensin treatment profoundly affected CTL killing capacity when conjugated with JY cells, an Epstein–Barr virus (EBV)-transformed B-cell line that has been largely used as a conventional target cell for human CTL and that exhibits high sensitivity to CTL attack<sup>3,4,10,18</sup> (Fig. 3a). For this analysis, we used JY cell instead of D10 cells since the higher sensitivity of these cells to CTL-mediated cytotoxicity allowed us to well define impact of treatment on CTL lytic potential. This treatment was not toxic for CTL activation since it did not affect IFN $\gamma$  production (Supplementary Fig 3). When D10 cells were conjugated with CTL that had been pretreated with monensin, their FM1-43 uptake was strongly reduced, indicating that efficient lethal hit delivery is required to trigger reparative membrane turnover in melanoma cells (Fig. 3b).

In a second step, we aimed to precisely define the role of perforin in eliciting melanoma cell reparation. To this end, we silenced perforin expression in antigen specific CTL clones by transfection with specific siRNA. This treatment strongly inhibited perforin expression in CTL when compared to transfection of CTL with control siRNA, as seen by FACS analysis (Fig. 3c). Moreover, perforin-silenced CTL exhibited inefficient killing capacity when conjugated with JY sensitive target cells (Fig. 3d).

When perforin-silenced CTL were conjugated with D10 cells the CTL-induced FM1-43 uptake in target cells was reduced, indicating that perforin-mediated pore formation at the lytic synapse is the triggering event of a reparative membrane turnover (Fig. 3e).

Having observed that increased membrane turnover in melanoma cells is triggered by efficient perforin-mediated cytotoxic attack, we investigated which signaling pathway might be triggered by perforin in target cells. Since cell reparation processes following physical and

chemical injuries are known to be  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent<sup>24</sup>, we asked whether  $\text{Ca}^{2+}$ -entry might be mandatory to trigger melanoma membrane turnover.

To address this point, D10 cells were pretreated with the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA-AM (50 $\mu\text{M}$ ) and FM1-43 uptake following conjugation with cognate CTL was investigated. The analysis showed that membrane turnover was reduced by pre-treating D10 cells with the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA-AM, both in basal conditions and following CTL attack, indicating that this phenomenon is  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent (Fig. 3f).

Taken together, the above results show that perforin-mediated pore formation is the triggering event of a melanoma cell reparative membrane turnover and that this response is  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent.

#### *$\text{Ca}^{2+}$ gradients are formed on the melanoma cell side of the lytic synapse*

The observation that melanoma cells under CTL attack accelerate their synaptic membrane turnover and that this phenomenon is  $\text{Ca}^{2+}$  dependent prompted us to investigate whether a synaptic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling might occur on the melanoma cell side of the lytic synapse.

To address this point, we monitored CTL/melanoma cell conjugates by spinning-disk time-lapse microscopy, with rate of 16 images/second allowing a better detection of the temporal and spatial characteristics of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase. CTL were previously loaded with Tubulin-Tracker Green to highlight microtubule dynamics while D10 cells were loaded with Fluo-4 AM to detect  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . We observed that melanoma cells underwent a rapid  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase upon CTL attack, which was detected much earlier than the repolarization of the CTL microtubule organizing center (MTOC, around which most of CTL lytic granules are located<sup>4</sup>) towards the lytic synapse in line with our previous reports (Fig. 4a and Movie 3 and Bertrand et al.,<sup>4</sup>).

Interestingly, the snapshot presented in Figure 4a (taken from Movie 3) suggests that  $[Ca^{2+}]_i$  increase begins within the synaptic area before propagating throughout the cell cytosol. This phenomenon is highly evident in an additional example of CTL/melanoma target cell interaction in which the formation of three hot spots of  $Ca^{2+}$  entry into the target cell can be observed immediately after contact with the cognate CTL (Fig. 4b Movie 4). To provide quantitative assessment of this phenomenon, we measured the Fluo-4 mean fluorescence intensity over time in the synaptic area compared to the distal area (Fig. 4b) in the cell-cell conjugate presented in Figure 4a. As shown in Fig. 4c,  $[Ca^{2+}]_i$  increase was detected earlier in the synaptic area when compared to the distal one. We next applied this measurement to a significant number of live CTL/melanoma cells conjugates collected from 4 independent experiments in order to assess the time required to reach half Fluo-4 fluorescence maximum intensity in the synaptic versus distal area in each melanoma cell (as depicted in Fig. 4d). Fig. 4e shows that the increase in Fluo-4 fluorescence intensity in the distal area was always delayed when compared to the synaptic area, in all analyzed conjugates, although the time required to reach the distal area was variable in the different melanoma cells.

Together, the above results show that  $[Ca^{2+}]_i$  increase rapidly occurs in melanoma cells upon CTL attack and that  $Ca^{2+}$  gradients are generated on the melanoma cell side of the lytic synapse.

#### *Localized $Ca^{2+}$ entry triggers swift melanoma cell defense at the lytic synapse*

We next investigated whether the observed early  $[Ca^{2+}]_i$  increase on the melanoma cell side of the lytic synapse might serve as an “alert signal”, allowing melanoma cells to rapidly undergo a lysosome secretory burst that protects them from CTL attack<sup>18</sup>.

To address this question we first investigated the impact of BAPTA-AM pretreatment of melanoma cells on  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by CTL lytic attack by spinning-disk microscopy.



To this end, the interaction between CTL and melanoma cells pretreated or not with 50  $\mu$ M BAPTA-AM was monitored by high time resolution spinning disk microscopy (16 images/second). In Figure 5a-b (Movie 5 and 6) are shown examples of untreated and BAPTA-AM pre-treated melanoma cell in which the effect of BAPTA strongly inhibits  $[Ca^{2+}]_i$  increase following contact with a CTL. BAPTA-AM treatment did not completely block  $[Ca^{2+}]_i$  increase in all melanoma cells analyzed. Analysis of 25 conjugates in untreated conditions and of 35 conjugates in which melanoma cells were pre-treated with BAPTA-AM (from 4 independent experiments) showed that 84% of untreated melanoma cells exhibited a detectable  $Ca^{2+}$  entry and that this fraction was reduced to 34% in BAPTA-treated melanoma cells. Interestingly, the onset of  $[Ca^{2+}]_i$  increase was very rapid in untreated melanoma cell (less than 2 minutes after CTL contact) while this process was delayed in the fraction of BAPTA-AM pretreated melanoma cells that still underwent  $[Ca^{2+}]_i$  increase, with a mean time of response of  $\sim 4$  minutes (Fig. 5c).

In a second step, melanoma cells were electroporated with *in vitro* transcribed mRNA coding for the transmembrane portion of CD107a coupled to mApple/pHluorin. This biosensor allows to readily detect lysosome exposure on the surface of cells by monitoring the increase in green fluorescence intensity of the pH-sensitive probe pHluorin<sup>25</sup>. CTL/tumor cell interaction was monitored by time-lapse spinning-disk microscopy.

pHluorin green fluorescence intensity was increased by treatment with  $NH_4Cl$  (an enhancer of cellular pH), thereby validating the pH sensitivity of the probe<sup>26</sup> (Supplementary Fig. 4). Live cell microscopy of individual melanoma cells showed that they exhibited a constitutive exposure of CD107a<sup>+</sup> vesicles on their surface as detected by moderate pHluorin signal (yellow fluorescence corresponding to pHluorin/mApple colocalization, Supplementary Fig. 5a).

We could detect an increase in green fluorescence synaptic signal in ~1/3 of the inspected antigen specific CTL/melanoma cell conjugates. Interestingly, upon CTL attack, an increased and dedicated exposure of mApple/pHluorin-tagged CD107a was rapidly detected at the lytic synapse (Fig. 6 a-c). This exposure rapidly occurred as shown in the examples depicted in Fig. 6a, in Supplementary Fig. 5 and in Movies 7-9. Analysis of several CTL/melanoma cell conjugates showed that initial CD107a<sup>+</sup> vesicle exposure in melanoma cells occurred mainly before and rarely simultaneously with CTL MTOC repolarization (Fig. 6d).

In a third step, we investigated the role of Ca<sup>2+</sup> pathway in the exposure of mApple/pHluorin-tagged CD107a acidic vesicles on the surface of melanoma cells under CTL attack. As shown in Fig. 6e-f and Movie 10, pretreatment of melanoma cells with 50  $\mu$ M BAPTA-AM limited synaptic exposure of CD107<sup>+</sup> vesicles and resulted in the rapid appearance of markers of the apoptotic process such as lysosome permeabilization (detected by a massive pHluorin green fluorescence emission) and caspase-3 activation<sup>27,28</sup>.

Together, our results illustrate that melanoma cell synaptic response are very rapid. They also establish a mechanistic link between initial localized and rapid Ca<sup>2+</sup> signaling at the lytic synapse and melanoma cell rapid defense to CTL attack.

#### *Interfering with the Ca<sup>2+</sup> pathway limits melanoma cell resistance to CTL attack*

We finally asked whether Ca<sup>2+</sup> signaling might provide a functional advantage to melanoma cells by triggering resistance to CTL-mediated cytotoxicity.

To address this question, D10 cells were pretreated with 50  $\mu$ M BAPTA-AM during 2 hours before conjugation with CTL. As shown in Figure 7a, this treatment resulted in an increased CTL-mediated cytotoxicity. A similar impact of pretreatment with BAPTA-AM on melanoma cell resistance to CTL attack was observed in 3 additional melanoma cell lines (Fig. 7b).

To further illustrate the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling in melanoma cell resistance to CTL attack, we silenced the expression of synaptotagmin VII (SytVII) the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor known to mediate lysosomal vesicle exocytosis<sup>29,30</sup>. Transfection of D10 cells with specific SytVII shRNA resulted in 80-90% reduction of SytVII expression (compared to cells transfected with control non-targeting shRNA), as detected by RT-qPCR and Western blot analysis (Supplementary Fig. 6 and Fig. 7c). Interestingly, SytVII-silenced D10 cells exhibited increased sensitivity to CTL-mediated cytotoxicity when compared to cells transfected with control non-targeting shRNA (Fig. 7d).

Together, the above results show that the  $\text{Ca}^{2+}$ /SytVII -dependent signaling pathway is a major component of the melanoma cell synaptic resistance. They imply that the first minutes of cell-cell contact are critical for target cells to deploy resistance mechanisms against perforin-mediated cytotoxicity.

## Discussion

$\text{Ca}^{2+}$  signaling is a key regulator of cellular life, involved in the function of virtually all biological systems including that of immune cells<sup>24</sup>. In T cells, TCR-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is crucial for several key responses including: cell-cell adhesion<sup>31</sup>, regulation of signaling enzymes<sup>32</sup>, actin cytoskeleton re-organization<sup>33</sup>, nuclear translocation of transcription factors<sup>34</sup> and cytotoxic granule secretion by killer cells<sup>35</sup>. A key feature of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in T cells is that its duration (that depends on the stability of contacts with antigen presenting cells) finely regulates T cell effector function. It is indeed well established that prolonged immunological synapse (IS) or sequential IS formation and sustained  $\text{Ca}^{2+}$  signaling are required in antigen-stimulated T cells for translocation of N-FAT into the T cell nucleus leading to cytokine gene transcription<sup>36–38</sup>. Interestingly, electrophysiology studies on isolated T cells and computational studies analyzing TCR-induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations revealed that, not only the duration of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, but also the frequency of its oscillations influence T cell responses<sup>39,40</sup>. While the parameter time is well inscribed into the paradigm of T lymphocyte activation, spatial characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in T lymphocyte responses remain to be elucidated.

In the present study we provide a first stepping stone to understand the role of localized  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in a key T cell function: lethal hit delivery by CTL. By focusing on the target cell side of the lytic synapse we reveal the striking capacity of melanoma cells to swiftly expose their LLE at the lytic synapse upon localized  $\text{Ca}^{2+}$  entry. We also show that  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated responses in melanoma cells play a key role in their resistance as indicated by increased sensitivity to CTL attack upon of  $\text{Ca}^{2+}$ /synaptotagmin VII pathway blockade.

Our study was rendered possible thanks to the development of a new straightforward method that allowed studying whether individual CTL are capable of secreting functional lytic granules and whether different target cells are more or less efficient in membrane repair

mechanisms (L. Filali et al. filed patent application; priority patent application number: EP18306576.2). We could thus unequivocally demonstrate that membrane dynamics in CTL not only starts early after conjugation with target cells, but that it even precedes CD107a exposure on cell surface (Supplementary Fig 2), indicating that membrane turnover starts extremely rapidly in killer cells. This observation is in line with our previous findings showing that a few lytic granules are rapidly secreted by CTL upon conjugation with target cells, before MTOC re-polarization<sup>41</sup>.

Although swift CTL responses might be instrumental to rapidly kill multiple sensitive target cells, it is tempting to speculate that they might, on the contrary, be detrimental when facing melanoma cells, since these cells possess an active membrane reparative turnover and rapidly speak back to CTL attack at the lytic synapse. Accordingly, results from single cell live imaging shown in Figure 6 illustrate that, within minutes after CTL attack (a time comparable to the time required for re-polarization of lytic granule-surrounded MTOC), melanoma cells expose their lysosome at the IS, thus mounting a synaptic shield in time for the arrival of the MTOC-associated bulk of cytotoxic molecules. Melanoma cells have thus acquired a mechanism allowing to “defuse” CTL localized synaptic attacks that takes advantage from the rapid “perception” of a few lytic granules released at the IS. As a consequence, delivering of packaged lytic molecules, such as soluble cytotoxic molecule containing exosomes<sup>42</sup>, might be, in principle, an interesting option to bypass melanoma cell synaptic resistance.

It is intriguing that responses based on rapid  $\text{Ca}^{2+}$  signaling emerge as key mediators of two opposing processes occurring on the two side of the IS. It is well established that a functional  $\text{Ca}^{2+}$  pathway is required for lytic granule release, as shown by the profound deficiency in lethal hit delivery in CTL from patients deficient in the Orai-STIM  $\text{Ca}^{2+}$  channels<sup>43</sup>. We show here that a virtually simultaneous  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mediates an opposing response on the other side of the synapse, underlying the importance of the first minutes of CTL/target cell

interaction in deciding the fate of the target cell. The importance of rapidity in the attack/counter attack events occurring at the lytic synapse is demonstrated by the results showing that the delay in  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by BAPTA-AM treatment (that in melanoma cells does not in all case block  $Ca^{2+}$  increase, but frequently delays it) results in an increased sensitivity of melanoma cells to CTL attack. In other words, when  $Ca^{2+}$  responses are not rapid enough, melanoma cells do not have the time to mount a defending fence at the lytic synapse.

Whether the rapid responses described in this study might have relevance *in vivo* is presently elusive. To address this question, it will be interesting to investigate whether the level of lysosomal markers and/or molecules involved in vesicular trafficking and membrane turnover might correlate with resistance to immune checkpoint blockade in large cohorts of metastatic melanoma patients.

An additional open question is whether such defense mechanisms might be shared by other tumor types. This possibility is conceivable since  $Ca^{2+}$ -dependent membrane reparative turnover is a general ancestral mechanism of plasma membrane reparation following physical or chemical injuries<sup>44</sup>. Other cells might therefore oppose a similar defense to CTL attack. A stronger or weaker impact of  $Ca^{2+}$ -dependent reparative mechanisms on the outcome of CTL/target cell interaction might depend on various parameters including the lysosomal mass of the cell, the basal rate of membrane turnover and its enhancement following CTL attack.

It is interesting to speculate that if  $Ca^{2+}$  signaling is a key mechanism implicated in ancestral plasma membrane reparation and in resistance to lytic molecules, TCR-coupled  $Ca^{2+}$  signaling might be viewed not only as a pathway involved in cell activation, but also as an ancestral protective mechanism evolved to protect CTL from their own cytotoxic molecules. According to this hypothesis, the rapid membrane turnover and cell surface exposure of CD107a (a lysosomal molecule considered to be involved in killer cell protection<sup>45</sup>) might be

part of an ancestral defense mechanism whereby CTL protect themselves from self-annihilation by the preventive exposure of a defending fence.

Our results can pave the road to novel approaches aiming at limiting tumor cell resistance to CTL attack. Several molecular mechanisms of resistance to cell death have been described in tumor cells, including the activation of anti-apoptosis pathways<sup>46-48</sup>.

In addition to those late mechanisms, we have recently shown that an early synaptic defense occurs in melanoma cells following CTL attack, based on lysosome secretion and perforin degradation by lysosomal enzymes<sup>18</sup>. Our present results extend previous data by showing that such a mechanism is part of ancestral calcium-dependent membrane repair process and is initiated by a rapid membrane turnover. Resistance of melanoma cells, as well as of other tumor cells to CTL attack might therefore be based also on the expression of “protective molecules” such as CD107a on their surface. Targeting these molecules might be the goal of novel selective immunotherapies.

Altogether, our study reveals that the rapidity and space-confinement of calcium-entry at the lytic synapse make of this signaling pathways an ideal alert signal for swift defense responses in tumor cells following immune killer cell attack. It helps to redefine the role of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the paradigm of CTL/target cell confrontation and to think about this signaling pathway as a potential target of immunotherapy.

### **Figure 1: Membrane turnover on the two sides of the lytic synapse**

Melanoma cells were either left unpulsed or pulsed during 2h with the antigenic peptide. After washing, target cells were conjugated with cognate CTL during 2, 5 or 15min in the presence of 10µg/ml FM1-43 in the medium. FACS plot show typical results from one experiment representative of 5 independent experiments, of FM1-43 fluorescence intensity either in the melanoma cell side (**a**, left panel) or CTL side (**a**, right panel) of the lytic synapse. Time kinetics of FM1-43 fluorescence intensity in D10 (**b**) or in EB81, M17, LB2259 melanoma cells (**d**) are shown. Time kinetics of the percentages of CTL FM1-43 positives cells following conjugation with D10 cells (**c**) or with EB81, M17, LB2259 (**e**) are shown. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Two-way ANOVA using GraphPad Prism was used to determine the statistical significance of differences.  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ .

### **Figure 2: Synaptic membrane turnover in melanoma cells after CTL attack**

Melanoma cells pulsed with the antigenic peptide were conjugated with CTL previously stained with PKH-67 in the presence of 1µg/ml FM4-64 in the medium. (**a,b**) Sequence of snapshots depicting one melanoma cell interacting with one CTL. (**a**) Snapshots depicting FM4-64 fluorescence in pseudo-color. (**b**) Snapshots depicting FM4-64 fluorescence in red and PKH-67 in green. For each snapshot, distribution profiles of FM4-64 and PKH-67 fluorescence intensity were analyzed across the yellow line at the indicated different time points. (**c**) One CTL before and after interaction with two melanoma cells. The first snapshot shows FM4-64 in pseudo-color and the second shows FM4-64 in red and PKH-67 in green, at the two different time points. For each snapshot, distribution profiles of FM4-64 and PKH-67 fluorescence intensity was analyzed across the yellow line.



**Figure 3: Melanoma cells undergo a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent reparative membrane turnover upon interaction with cognate CTL**

(a, b) CTL were either pretreated or not with 40 $\mu\text{M}$  of monensin and conjugated with target cells previously incubated in the presence or the absence of the antigenic peptide. (a) After 4h of conjugation, CTL-mediated cytotoxicity in the sensitive target cells JY was quantified by measuring 7-AAD uptake by FACS analysis, representative of dead cells percentage. (b) D10 cells were conjugated with either untreated CTL or monensin pretreated CTL, during 15min in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  FM1-43. The FM1-43 fluorescence intensity in D10 cells interacting with the different CTL cohorts is shown. (c, d, e) CTL were electroporated with siRNA control or with siRNA targeting perforin. (c) One representative histogram of intracellular perforin expression by FACS analysis in CTL electroporated with siRNA control or with siRNA targeting perforin. (d) After 4h of conjugation, cytotoxicity induced by transfected CTL in JY cells was quantified by measuring 7-AAD uptake by FACS analysis. (e) D10 cells were conjugated with either siRNA control CTL, or silenced perforin CTL, during 15min in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  FM1-43. FM1-43 fluorescence intensity in D10 is shown. (f) D10 cells were either pretreated or not with 50 $\mu\text{M}$  BAPTA-AM in the presence or absence of the antigenic peptide. Untreated or pretreated D10 cells were conjugated with CTL during 15min in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  FM1-43. FM1-43 fluorescence intensity in D10 is shown. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Wilcoxon paired *t*-test using GraphPad Prism was used to determine the statistical significance of differences. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

**Figure 4:  $\text{Ca}^{2+}$  gradients are formed on the melanoma cell side of the lytic synapse**

D10 cells were loaded with Fluo4-AM and CTL with Tubulin tracker green. Conjugates formation was analyzed by spinning disk time-lapse microscopy. (a,b) Snapshots depicting  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in melanoma cells and MTOC in CTL with a time resolution of 1 image every 60

milliseconds after CTL contact. (c) Scheme of fluorescence intensity quantification strategy in the synaptic area compared to the distal area. (d) Fluo4-AM fluorescence intensity over time in the synaptic and distal areas. The time required to achieve half of the maximum intensity of the  $[Ca^{2+}]_i$  increase in D10 cells in the synaptic area and the distal area was quantified to calculate the  $\Delta$  time. (e) The time required to achieve half of the maximum intensity in the distal area was quantified in 22 conjugates from 4 independent experiments.  $[Ca^{2+}]_i$  increase was always detected before in the synaptic area and after in the distal area (time 0, red spots), the delay to achieve half of the maximum intensity in the distal area was calculated (blue spots). Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Paired *t*-test using GraphPad Prism software was used to determine the statistical significance of differences between groups. \*\*\*\* $P < 0.0001$

**Figure 5: BAPTA-AM affects  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by CTL attack**

Melanoma cells either untreated or pretreated with 50 $\mu$ M BAPTA-AM were stained with Fluo4-AM. CTL were stained with Tubulin tracker green. Conjugate formation was analyzed by spinning disk time-lapse microscopy. (a) Snapshots depicting  $[Ca^{2+}]_i$  in untreated and BAPTA-AM pretreated D10 cells. (b) Ratio of Fluo4-AM fluorescence intensity (FI) on initial Fluo4-AM FI (at CTL contact time points) are represented during the first two minutes of contact with CTL. (c) Time required to achieve Fluo4-AM maximum FI from CTL contact in conjugates with  $[Ca^{2+}]_i$  increase (21 analyzed conjugates in untreated conditions and 12 in BAPTA-AM pretreated conditions). Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Unpaired *t*-test using GraphPad Prism software was used to determine the statistical significance of differences between the groups. \* $P < 0.05$

**Figure 6: Rapid  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent melanoma cell synaptic LLE exposure after CTL attack**

Melanoma cells were transfected with mRNA coding for CD107a-mApple-pHluorin and conjugated with tubulin labelled CTL. Fluorescence intensity was analyzed by spinning disk time lapse microscopy. In some experiments, caspase-3 substrate was added to the medium. **(a)** Snapshots depicting mApple (red), pHluorin (green) and tubulin fluorescence (dark blue) upon melanoma cell contact with CTL. **(b)** Gating strategy for pHluorin fluorescence intensity analysis in the synaptic area. **(c)** pHluorin fluorescence intensity over time in the synaptic area after contact with cognate CTL. **(d)** Time required to detect pHluorin fluorescence in the melanoma cell compared to the time required to detect CTL MTOC polarization toward the lytic synapse. **(e,f)** CD107a-mApple-pHluorin tagged melanoma cells were pretreated or not with 50 $\mu$ M BAPTA-AM and conjugated with CTL. **(e)** Snapshots depicting BAPTA-AM pretreated melanoma cell in contact with cognate CTL. **(f)** Percentage of D10 cells exhibiting synaptic pHluorin staining or caspase-3 staining D10 cells either untreated or treated by BAPTA-AM (15 conjugates analyzed in untreated conditions and 16 in BAPTA-AM pretreated conditions) from 3 independent experiments. Wilcoxon paired *t*-test using GraphPad Prism was used to determine the statistical significance of differences  $**P<0.01$ .

**Figure 7:  $\text{Ca}^{2+}$  pathway inhibition in melanoma cells increases their susceptibility to CTL attack**

**(a,b)** Melanoma cells were either untreated or pretreated with 50 $\mu$ M BAPTA-AM during 2h in the presence or the absence of the antigenic peptide and were conjugated for 4h with CTL. Cytotoxicity was quantified by measuring 7-AAD uptake in target cells by FACS analysis. **(a)** JY cells, were used as control of CTL cytotoxicity. % of 7AAD<sup>+</sup> cells are represented

after conjugation with D10 cells or JY cells **(a)** or with EB81, M17 or LB2259 **(b)**. **(c)** Western-blot analysis of D10 cells transfected with shRNA targeting synaptotagmin VII or control shRNA. **(d)** Transfected D10 cells were conjugated with CTL for 4h; % of 7AAD<sup>+</sup> cells is shown. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Wilcoxon test **(a,b)** or Mann Whitney test **(d)** using GraphPad Prism software was used to determine the statistical significance of differences between the groups. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### **Supplementary figure 1: Gating strategy of FM1-43 analysis on both sides of the lytic synapse**

First gate was on total cells. Live cells (based on viability dye efluor 780 fluorescence) were then selected. CTL were discriminated from melanoma cells on the basis of their CTV staining. FM1-43 geometric mean levels for melanoma cells and percentage of FM1-43 positives cells for CTL were measured. Cell-cell doublets were excluded from the analysis.

### **Supplementary figure 2: Comparison of FM1-43 uptake in CTL and CD107a exposure on their surface as parameters of CTL activation following antigenic stimulation**

D10 cells were either unpulsed or pulsed with different concentrations of antigenic peptide and conjugated with cognate CTL for 2, 5 or 15min. (a) After conjugation CD107a exposure on CTL surface was quantified by flow cytometry. Numbers indicate percentages of CD107a<sup>+</sup> cells. (b) During cell-cell conjugation, 10µg/ml of FM1-43 was added to culture medium. FM1-43 fluorescence intensity of CTL is shown. Numbers indicate percentages of cells with an increased FM1-43 uptake compared to the unpulsed condition. Results are from one experiment out of two independent experiments.

### **Supplementary figure 3: IFN $\gamma$ production in monensin pretreated CTL**

CTL were either pretreated or not with 40µM monensin for 2h, washed and conjugated with either unpulsed or pulsed JY cells during 2h. Following intracellular staining IFN $\gamma$  production was analyzed by FACS. Histograms are representative of 2 independent experiments.

### **Supplementary figure 4: pHluorin fluorescence emission in CD107a-mApple-pHluorin transfected melanoma cells is increased by treatment with NH<sub>4</sub>Cl**

**(a,b)** Melanoma cells were transfected with mRNA coding for CD107a-mApple-pHluorin, images of transfected cells (16h) were acquired before and after the addition of 500mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in culture medium. **(b)** Fold increase of pHluorin fluorescence intensity after  $\text{NH}_4\text{Cl}$  treatment was quantified in 10 cells. Unpaired t-test using GraphPad Prism software was used to determine the statistical significance of differences between the groups. \*\*\*\* $P < 0.0001$

**Supplementary figure 5: Additional examples of rapid pHluorin increase in melanoma cells at the synaptic area upon CTL attack**

Melanoma cells were transfected with mRNA coding for CD107a-mApple-pHluorin and conjugated with tubulin labelled CTL. Snapshots depicting mApple, pHluorin and tubulin fluorescence upon D10 cells in contact with one **(a)** or three **(b)** CTL.

**Supplementary figure 6: Synaptotagmin VII expression in D10 cells transfected with either shRNA targeting SytVII or control shRNA**

**(a)** mRNA coding for SytVII was quantified by RT-qPCR in three independent experiments. % of SytVII mRNA expression normalized on GAPDH expression are represented. **(b)** SytVII protein expression levels were analyzed by Western-Blot in three independent experiments. % of SytVII expression normalized on actin expression are represented.

## Materials and Methods

### Cell culture

Human CD8<sup>+</sup> T-cell lines were purified from healthy donor blood samples using the RosetteSep Human CD8<sup>+</sup> T Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies). For cloning, HLA-A2-restricted CD8<sup>+</sup> T cells specific for the NLVPMVATV peptide or the VLAELVKQI peptide of the cytomegalovirus protein pp65 were single cell sorted into 96-U-bottom plates using a BD FACSAria II cell sorter using tetramer staining. Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5% human AB serum (Inst. Biotechnologies J.BOY), minimum essential amino acids, HEPES and sodium pyruvate (Invitrogen), 100 IU/ml human rIL-2 and 50 ng/ml human rIL-15 (Miltenyi). CD8<sup>+</sup> T-cell clones were stimulated in complete RPMI/HS medium containing 1 mg/ml PHA with 1 x 10<sup>6</sup> per ml 35 Gy irradiated allogeneic peripheral blood mononuclear cells (isolated on FicollPaque Gradient from buffy coats of healthy donors) and 1 x 10<sup>5</sup> per ml 70 Gy irradiated EBV-transformed B cells. Re-stimulation of clones was performed every 2 weeks. Blood samples were collected and processed following standard ethical procedures (Helsinki protocol), after obtaining written informed consent from each donor and approval for this study by the local ethical committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II).

HLA-A2<sup>+</sup> human melanoma cell lines used were isolated from metastatic melanoma patients: D10 (kindly provided by Dr G. Spagnoli, Basel, Switzerland), M17 (kindly provided by Dr F. Jotereau, Nantes, France), EB81-MEL.B and LB2259-MEL.A (kindly provided by Dr P. Coulie and N.V. Baren, Brussels, Netherlands). EBV-transformed B cells (JY) HLA-A2<sup>+</sup> were used as sensitive target cells. All these target cells were cultured in RPMI 1640 GlutaMAX supplemented with 10% FCS and 50µmol/L 2-mercaptoethanol, 10mM HEPES, 1X MEM NEAA (Gibco), 1X Sodium pyruvate (Sigma), 10µg/ml ciprofloxacin (AppliChem).

Our cell lines are routinely screened for mycoplasma contamination using MycoAlert mycoplasma detection kit (Lonza).

### **FM1-43 incorporation by FACS analysis**

Melanoma cells were left unpulsed or pulsed with 10 $\mu$ M antigenic peptide (or lower concentrations when indicated) during 2h at 37°C/5%CO<sub>2</sub>, washed three times and subsequently transferred to a 96-well U-bottom plate at 20 x 10<sup>3</sup> cells per 25 $\mu$ l RPMI 5% FCS/HEPES. CTL were previously stained with CTV (Invitrogen) for 20min at 37°C/5% CO<sub>2</sub>, washed and added to the target cells at two CTL versus one target cell ratio in 25 $\mu$ l RPMI 5% FCS/HEPES. 50 $\mu$ l of 20 $\mu$ g/ml FM1-43 (Invitrogen) in RPMI 5% FCS/HEPES were added in 50 $\mu$ l of cells already contained in the well (FM1-43 final concentration was 10 $\mu$ g/ml). In some experiments D10 cells were pretreated with 50 $\mu$ M BAPTA-AM (Invitrogen) and thoroughly washed before conjugation with CTL. Cells were pelleted for 1min, 455g and incubated at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 2min, 5min or 15min. At the end of each incubation time, CTL/melanoma cell co-cultures were resuspended and washed in ice-cold PBS containing 2mM EDTA to dissociate CTL/melanoma cell conjugates. Cells were stained with fixable viability dye eFluor 780 (eBiosciences) on ice at 4°C for 30min in FACS buffer (PBS 1% HS, 1% FCS, 0.01% Azide). Samples were acquired using MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi). Results were analyzed using the FlowJo 10 software.

### **CTL CD107a exposure**

D10 cells were left unpulsed or pulsed with 0.01nM to 10 $\mu$ M of antigenic peptide during 2h at 37°C/5% CO<sub>2</sub>, washed three times and subsequently transferred to a 96-well U-bottom plate at 20 x 10<sup>3</sup> cells per 50 $\mu$ l RPMI 5% FCS/HEPES. CTL were previously stained with 0.1 $\mu$ M CMFDA for 20min at 37°C/5% CO<sub>2</sub>, washed and added to the target cells at two CTL



versus one target cell ratio in 50µl RPMI 5% FCS/HEPES. Cells were pelleted for 1min, 455g and incubated at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 2min, 5min or 15min. At the end of each incubation time, CTL/melanoma cell co-cultures were resuspended and washed in ice-cold PBS containing 2mM EDTA. Cells were stained with fixable viability dye eFluor 450 (eBiosciences) and with anti-human CD107a PE-Cy7 (10µg/ml; BD Biosciences) on ice at 4°C for 30min in FACS buffer. Samples were acquired using MACS Quant Analyzer VYB (Miltenyi). Results were analyzed using the FlowJo 10 software.

### **Cytotoxic assay**

Target cells were left unpulsed or pulsed with 10µM antigenic peptide during 2h at 37°C/5% CO<sub>2</sub>, washed three times and subsequently transferred to a 96-well U-bottom plate at 20 x 10<sup>3</sup> cells per 100µl RPMI 5% FCS/HEPES. CTL were previously stained with 0.1µM CMFDA for 30min at 37°C/5% CO<sub>2</sub>, washed and added to the target cells at 4 CTL versus one target cell ratio in 100µl RPMI 5% FCS/HEPES. Cells were pelleted for 1min, 455g and incubated at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 4h. In some experiments CTL were pretreated with 40µM monensin (Sigma Aldrich) and thoroughly washed before conjugation with target cells or pre-transfected with perforin siRNA. In additional experiments, melanoma cells were pretreated with 50µM BAPTA-AM (Invitrogen) and thoroughly washed before conjugation with CTL. In a supplementary set of experiments D10 cells were previously transfected with a plasmid coding for SytVII shRNA. Before FACS analysis, 0.25µg 7-aminoactinomycin D (7-AAD; BD Biosciences) were added to each sample to measure the percentage of death target cells. Samples were acquired using MACS Quant Analyzer VYB (Miltenyi). Results were analyzed using the FlowJo 10 software.

### **Production of mRNA coding for CD107a-mApple-pHluorin *in vitro***

The vector pmApple-LAMP1-TMD-pHluorin is a gift from Dr. R. Murrell-Legnado, Sussex University, UK. To produce mRNA coding for CD107a-mApple-pHluorin by *in vitro* transcription, the minimal sequence promoter for T7 RNA polymerase was introduced into the plasmid using Quickchange II site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) according to manufacturer's protocol with insert T7 primer F: ATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCTAATACGACTCACTATAGAGATCCGCTAGCGCTACCGG and insert T7 primer R: CCGGTAGCGCTAGCGGATCTCTATAGTGAGTCGTATTAGACGGTTCCTAAACCA GCTCTGCTTATAT. The linearized plasmid DNA by NotI digestion that contain the T7 RNA polymerase promoter site is then used as template for *in vitro* transcription with mMESSAGEmACHINE T7 Ultra kit according to manufacturer's recommendations.

### **Transfection of CTL and melanoma cells**

1 x 10<sup>6</sup> CTL washed in OPTI-MEM (Gibco) medium were resuspended in 100µl OPTI-MEM and transferred in electroporation cuvettes (0.2cm, Bio-rad). 100pmol of three different siRNA targeting mRNA coding for perforin (ID: 6436 5'-GGCUUAUCUCCAACUACGGtt3', 6529 5'-GGUCAACAUAGGCAUCCACtt 3', 6603 5'-GGUGAGAUGCAACCUGAAUtt 3') or non-targeting siRNA were added. Cell suspensions containing 300pmol of siRNA were electroporated by a pulse of 300V for 2msec with a Squarewave Gene PulserXcell Electroporation system (Bio-rad). Electroporated CTL were transferred into prewarmed culture medium and used 16h after electroporation. Transfection efficiency was evaluated by flow cytometry.

8 x 10<sup>5</sup> D10 cells washed in OPTI-MEM medium were resuspended in 100µl OPTI-MEM and transferred in electroporation cuvettes (0.2cm). 5µg or 7µg of capped and tailed RNA coding for CD107a-mApple-pHluorin were added in the cell suspension. After

electroporation at 300V for 2msec, with a Squarewave Gene PulserXcell Electroporation systems (Bio-rad) cells were seeded in prewarmed culture medium and used 16h after electroporation. Transfection efficiency was evaluated by flow cytometry.

Transfection of  $1 \times 10^6$  D10 cells with 6 $\mu$ g plasmids coding for three different shRNA targeting SytVII or a non-targeting shRNA plasmid (Sigma, shSytVII: TRCN0000380620 5'GTACCGGAGCACTGGAAGGACATGATTGCTCGAGCAATCATGTCCTTCCAGTGCTTTTTTTG3', TRCN00003187685'CCGGCCCTGAATGTCGAGGATAGTACTCGAGTACTATCCTCGACATTCAGGGTTTTTG3', TRCN00003797445'GTACCGGTCAAAGCCCGGAACCTCAAAGCTCGAGCTTTGAGGTTCCGGGCTTTGATTTTTTTG3', and control: no specific target SHC002:5'-CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTT3') were performed using Lipofectamine 3000 Reagent (Sigma Life Science) according to the manufacturer's recommendations. Transfected cells were selected by puromycin treatment.

### **Time-lapse microscopy**

D10 cells were pulsed with 10 $\mu$ M peptide, washed and seeded at  $2 \times 10^4$  cells per well on poly-D-lysine-coated 15-well chambered slides (Ibidi) 5min before imaging. Chambered slides were mounted on a heated stage within a temperature-controlled chamber maintained at 37°C and constant 5% CO<sub>2</sub> concentration. At the beginning of recording  $8 \times 10^4$  CTL were added.

To monitor FM4-64 incorporation in melanoma cell/CTL conjugates, CTL were previously stained with PKH-67 green fluorescent cell linker (Sigma) for 1min and washed before addition in the chambered slides. FM4-64 (Invitrogen) at a final concentration of 1 $\mu$ g/ml was added in the culture medium before starting the acquisition.

To monitor  $[Ca^{2+}]_i$  increase in melanoma cells, D10 cells were preloaded with 5ng/ $\mu$ l Fluo-4, AM, (Molecular Probes) during 30min and washed before seeding in chambered slides. CTL were preloaded with Tubulin Tracker Green (Invitrogen) and washed before their addition in the chambered slides.

To monitor CD107a exposure in melanoma cells, D10 cells transfected with CD107a-mApple-pHluorin construct were used. CTL were previously stained with ViaFluor 405 or 647 live cell microtubule stain (Biotium) according the manufacturer's recommendations. In some experiments 5 $\mu$ M of NucView 405 caspase-3 substrate (Biotium) was added in the culture medium. In a set of experiments transfected D10 cells were pretreated with 50 $\mu$ M BAPTA-AM (Invitrogen).

All time-lapse microscopy experiments were acquired on a spinning-disk microscope running on Metamorph software. Analyses were performed using Image J software.

### **Western blot analysis of SytVII expression**

2.5 x 10<sup>6</sup> of transfected D10 cells washed in cold PBS were diluted in lysis buffer (25mM tris hydrochloride, 150mM sodium chloride, 1% NP-40, complete protease inhibitor cocktail). After 5min on ice lysis extracts were centrifuged 14,000g for 15 min to pellet DNA. The supernatant was collected. Reduced 10% SDS gels were run and blotted onto a nitrocellulose membrane. After blocking with 3% nonfat dry milk in Tris-buffered saline with Tween (TBST) for 1h, the membrane was incubated with 10 $\mu$ g/ml rabbit anti-SytVII Ab (abcam) overnight at 4°C followed by 2h incubation with anti-rabbit IgG HRP (SouthernBiotech). Anti-actin Ab was used as endogenous control for normalization (after stripping procedure of the membranes). The blots were developed using ECL detection reagent (GE Healthcare). Western blot images were acquired using ChemiDoc MP System (Bio-Rad).

### **cDNA synthesis and PCR**

RNA isolation was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and RNA concentration was assessed using the NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) system. RNA was converted to complementary DNA (cDNA) using the Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies).

The gene expression of SytVII (Hs01590513\_m1; sequence: 5'-in progress) was evaluated by real-time quantitative (RT qPCR) using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) according to manufacturer's recommendations, using a LightCycler 480 System (Riche Life Sciences). All reactions were performed in triplicates and relative gene expression levels were evaluated using the comparative CT (threshold cycle) method (2-deltaCT). GAPDH (Hs03929097\_g1; sequence: 5'-CAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACT-3') was used as endogenous controls for normalization.

## References

1. Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S. & Griffiths, G. M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity***15**, 751–761 (2001).
2. Law, R. H. P. *et al.* The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature***468**, 447–451 (2010).
3. Faroudi, M., Zaru, R., Paulet, P., Muller, S. & Valitutti, S. Cutting Edge: T Lymphocyte Activation by Repeated Immunological Synapse Formation and Intermittent Signaling. *J. Immunol.***171**, 1128–1132 (2003).
4. Bertrand, F. *et al.* An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.***110**, 6073–6078 (2013).
5. Lopez, J. A., Brennan, A. J., Whisstock, J. C., Voskoboinik, I. & Trapani, J. A. Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol.***33**, 406–412 (2012).
6. Baran, K. *et al.* The Molecular Basis for Perforin Oligomerization and Transmembrane Pore Assembly. *Immunity***30**, 684–695 (2009).
7. Lopez, J. A. *et al.* Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood***121**, 2659–2668 (2013).
8. Thiery, J. *et al.* Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat. Immunol.***12**, 770–777 (2011).
9. Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T. J. & Eisen, H. N. Evidence that a single peptide–MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity***4**, 565–571 (1996).

10. Valitutti, S., Müller, S., Dessing, M. & Lanzavecchia, A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J. Exp. Med.***183**, 1917–1921 (1996).
11. Purbhoo, M. A., Irvine, D. J., Huppa, J. B. & Davis, M. M. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.***5**, 524–530 (2004).
12. de Saint Basile, G., Ménasché, G. & Fischer, A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.***10**, 568–579 (2010).
13. Dustin, M. L. & Long, E. O. Cytotoxic immunological synapses: NK and CTL synapses. *Immunol. Rev.***235**, 24–34 (2010).
14. Stinchcombe, J. C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S. & Griffiths, G. M. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature***443**, 462–465 (2006).
15. Huse, M., Quann, E. J. & Davis, M. M. Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nat. Immunol.***9**, 1105 (2008).
16. Gajewski, T. F. Failure at the Effector Phase: Immune Barriers at the Level of the Melanoma Tumor Microenvironment. *Clin. Cancer Res.***13**, 5256–5261 (2007).
17. Speiser, D. E., Ho, P.-C. & Verdeil, G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat. Rev. Immunol.***16**, 599–611 (2016).
18. Khazen, R. *et al.* Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nat. Commun.***7**, 10823 (2016).
19. Caramalho, Í., Faroudi, M., Padovan, E., Müller, S. & Valitutti, S. Visualizing CTL/melanoma cell interactions: multiple hits must be delivered for tumour cell annihilation. *J. Cell. Mol. Med.***13**, 3834–3846 (2009).

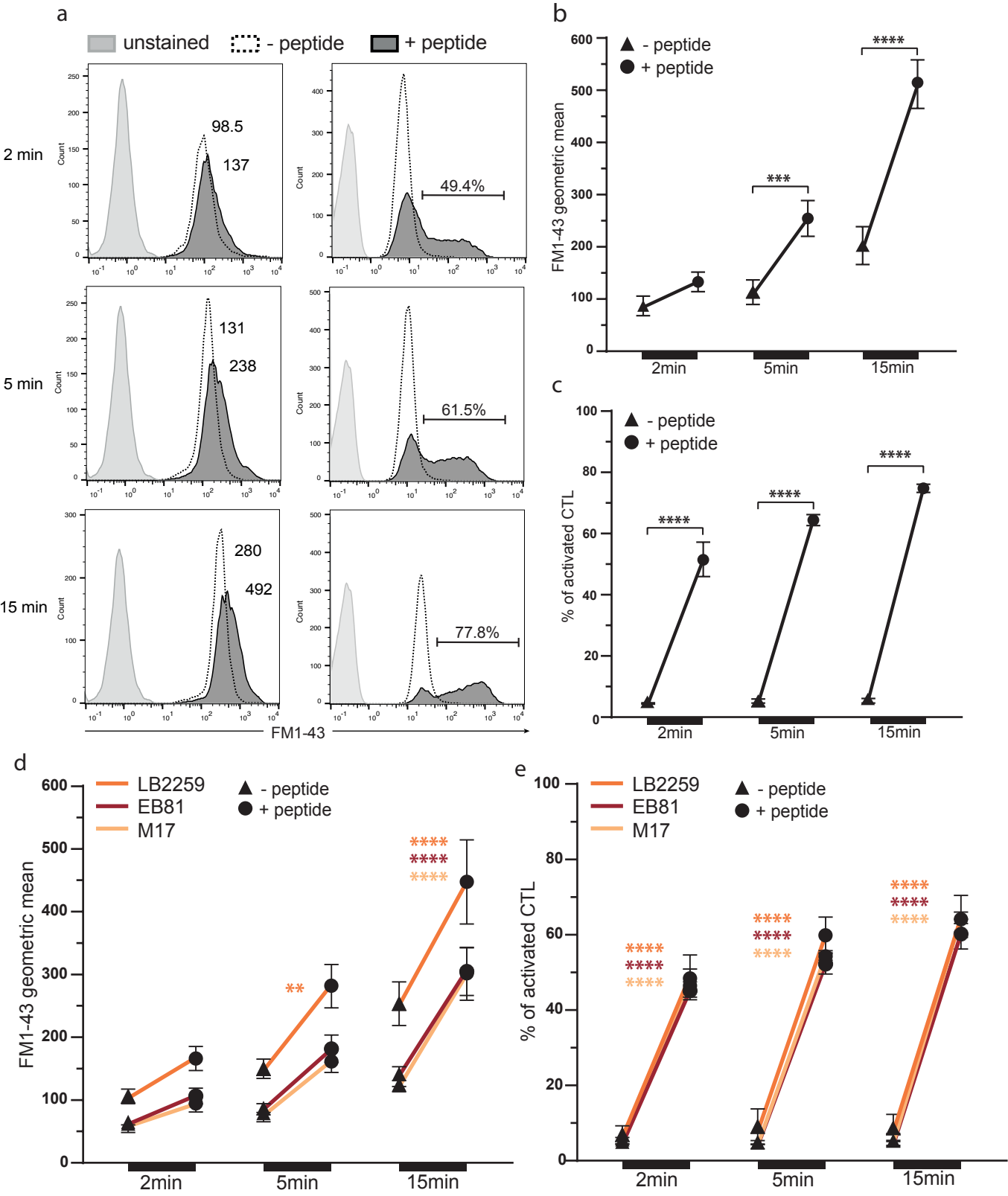
20. Brumback, A. Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. *Methods***33**, 287–294 (2004).
21. Lorenzo-Herrero, S., Sordo-Bahamonde, C., Gonzalez, S. & López-Soto, A. CD107a Degranulation Assay to Evaluate Immune Cell Antitumor Activity. in *Cancer Immunosurveillance* (eds. López-Soto, A. & Folgueras, A. R.) vol. 1884 119–130 (Springer New York, 2019).
22. Nakazato, K. & Hatano, Y. Monensin-mediated antiport of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> across liposome membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.***1064**, 103–110 (1991).
23. Kataoka T1, *et al.* Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950***156**, 3678–86 (1996).
24. Cheng, X., Zhang, X., Yu, L. & Xu, H. Calcium signaling in membrane repair. *Semin. Cell Dev. Biol.***45**, 24–31 (2015).
25. Carisey, A. F., Mace, E. M., Saeed, M. B., Davis, D. M. & Orange, J. S. Nanoscale Dynamism of Actin Enables Secretory Function in Cytolytic Cells. *Curr. Biol.***28**, 489–502.e9 (2018).
26. Liu, D., Martina, J. A., Wu, X. S., Hammer III, J. A. & Long, E. O. Two modes of lytic granule fusion during degranulation by natural killer cells. *Immunol. Cell Biol.***89**, 728–738 (2011).
27. Tyas, L., Brophy, V. A., Pope, A., Rivett, A. J. & Tavaré, J. M. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO Rep.***1**, 266–270 (2000).
28. Johansson, A.-C. *et al.* Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis***15**, 527–540 (2010).



29. Martinez, I. *et al.* Synaptotagmin VII Regulates Ca<sup>2+</sup>-Dependent Exocytosis of Lysosomes in Fibroblasts. *J. Cell Biol.***148**, 1141–1150 (2000).
30. Rao, S. K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T. & Andrews, N. W. Identification of SNAREs Involved in Synaptotagmin VII-regulated Lysosomal Exocytosis. *J. Biol. Chem.***279**, 20471–20479 (2004).
31. Lomakina, E. B. & Waugh, R. E. Signaling and Dynamics of Activation of LFA-1 and Mac-1 by Immobilized IL-8. *Cell. Mol. Bioeng.***3**, 106–116 (2010).
32. Pfeifhofer-Obermair, C., Thuille, N. & Baier, G. Involvement of distinct PKC gene products in T cell functions. *Front. Immunol.***3**, (2012).
33. Dushek, O. *et al.* Effects of Intracellular Calcium and Actin Cytoskeleton on TCR Mobility Measured by Fluorescence Recovery. *PLoS ONE***3**, e3913 (2008).
34. Hogan, P. G. Calcium–NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion. *Cell Calcium***63**, 66–69 (2017).
35. Lyubchenko, T. A., Wurth, G. A. & Zweifach, A. Role of Calcium Influx in Cytotoxic T Lymphocyte Lytic Granule Exocytosis during Target Cell Killing. *Immunity***15**, 847–859 (2001).
36. Valitutti, S. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.***181**, 577–584 (1995).
37. Faroudi, M., Zaru, R., Paulet, P., Muller, S. & Valitutti, S. Cutting Edge: T Lymphocyte Activation by Repeated Immunological Synapse Formation and Intermittent Signaling. *J. Immunol.***171**, 1128–1132 (2003).
38. Gunzer, M., Borgmann, S. & Grabbe, S. Antigen Presentation in Extracellular Matrix: Interactions of T Cells with Dendritic Cells Are Dynamic, Short Lived, and Sequential. 10.

39. Faroudi, M. *et al.* Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc Natl Acad Sci U A***100**, 14145–50 (2003).
40. Dolmetsch, R. E., Xu, K. & Lewis, R. S. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. **392**, 4 (1998).
41. Bertrand, F. *et al.* An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proc Natl Acad Sci U A***110**, 6073–8 (2013).
42. Fu, W. *et al.* CAR exosomes derived from effector CAR-T cells have potent antitumour effects and low toxicity. *Nat. Commun.***10**, (2019).
43. Shaw, P. J. & Feske, S. Regulation of lymphocyte function by ORAI and STIM proteins in infection and autoimmunity: Regulation of lymphocyte function by ORAI and STIM proteins. *J. Physiol.***590**, 4157–4167 (2012).
44. Cheng, X., Zhang, X., Yu, L. & Xu, H. Calcium signaling in membrane repair. *Semin Cell Dev Biol***45**, 24–31 (2015).
45. Cohnen, A. *et al.* Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood***122**, 1411–1418 (2013).
46. Lickliter, J. D. *et al.* Small-molecule Bcl-2 inhibitors sensitise tumour cells to immune-mediated destruction. *Br. J. Cancer***96**, 600–608 (2007).
47. Jazirehi, A. R., Nazarian, R., Torres-Collado, A. X. & Economou, J. S. Aberrant apoptotic machinery confers melanoma dual resistance to BRAFV600E inhibitor and immune effector cells: immunosensitization by a histone deacetylase inhibitor. **16**.
48. Murakami, T. *et al.* Immune Evasion by Murine Melanoma Mediated through CC Chemokine Receptor-10. *J. Exp. Med.***198**, 1337–1347 (2003).

Figure 1



**Figure 2**

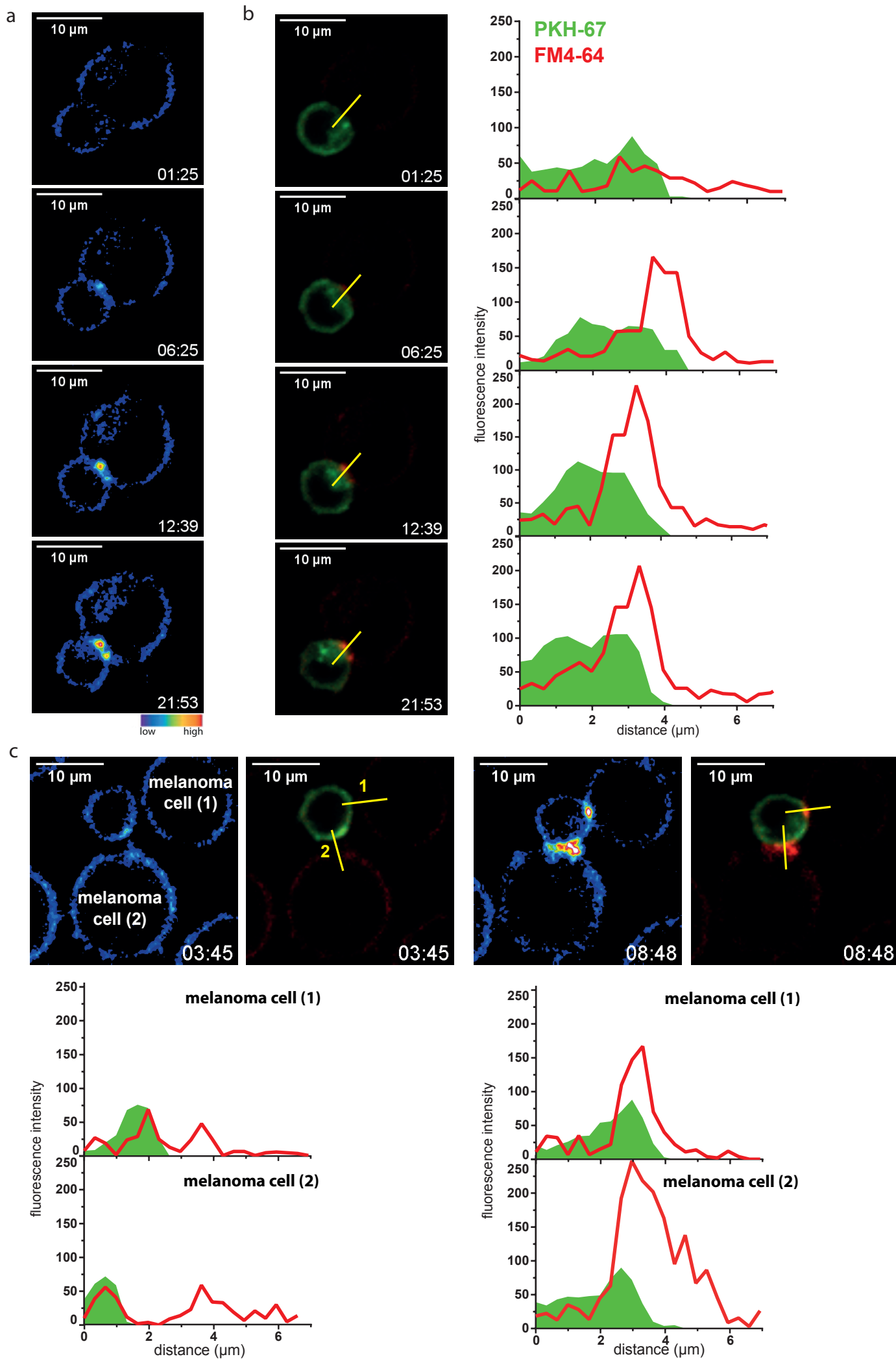


Figure 3

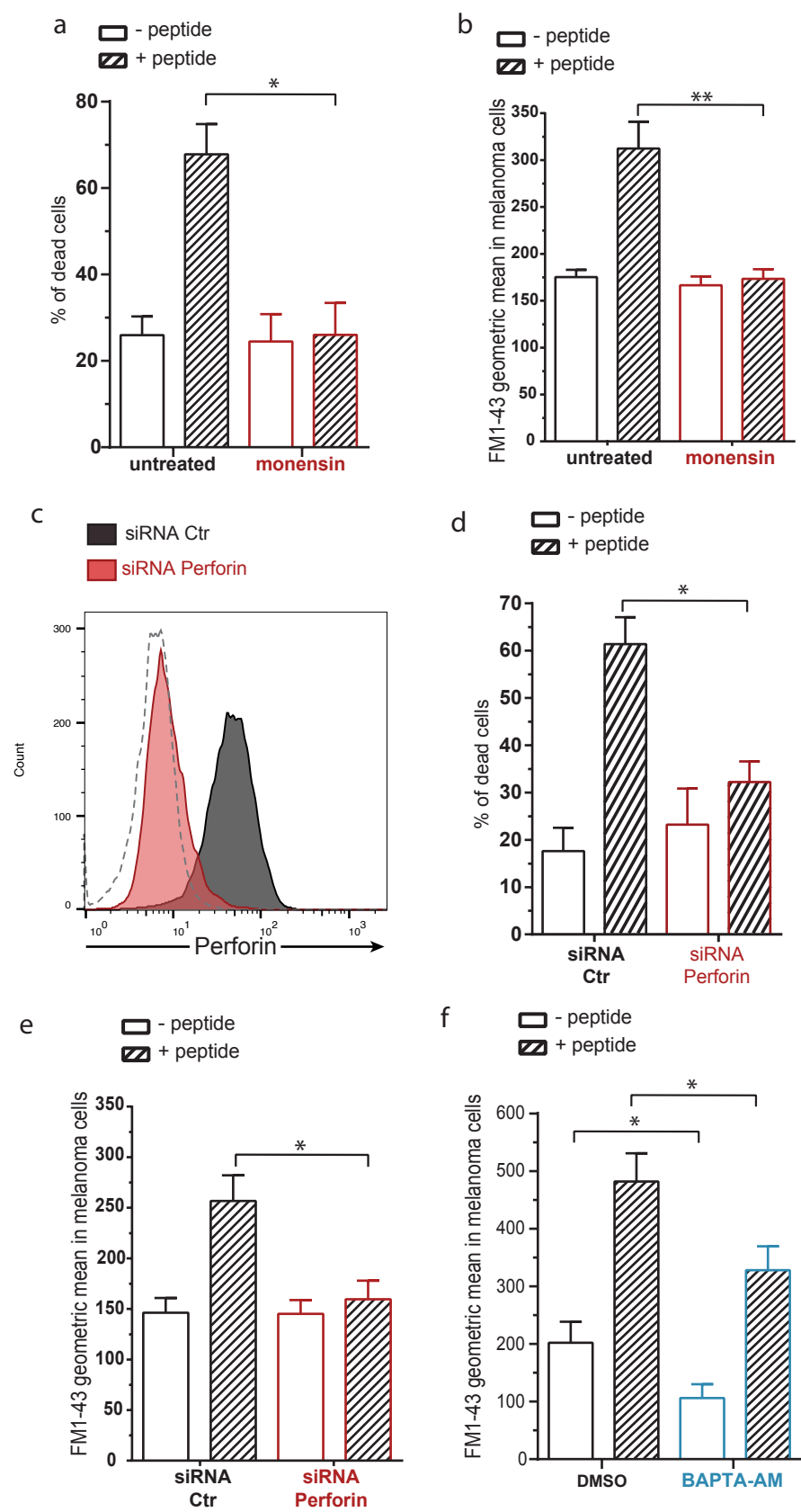


Figure 4

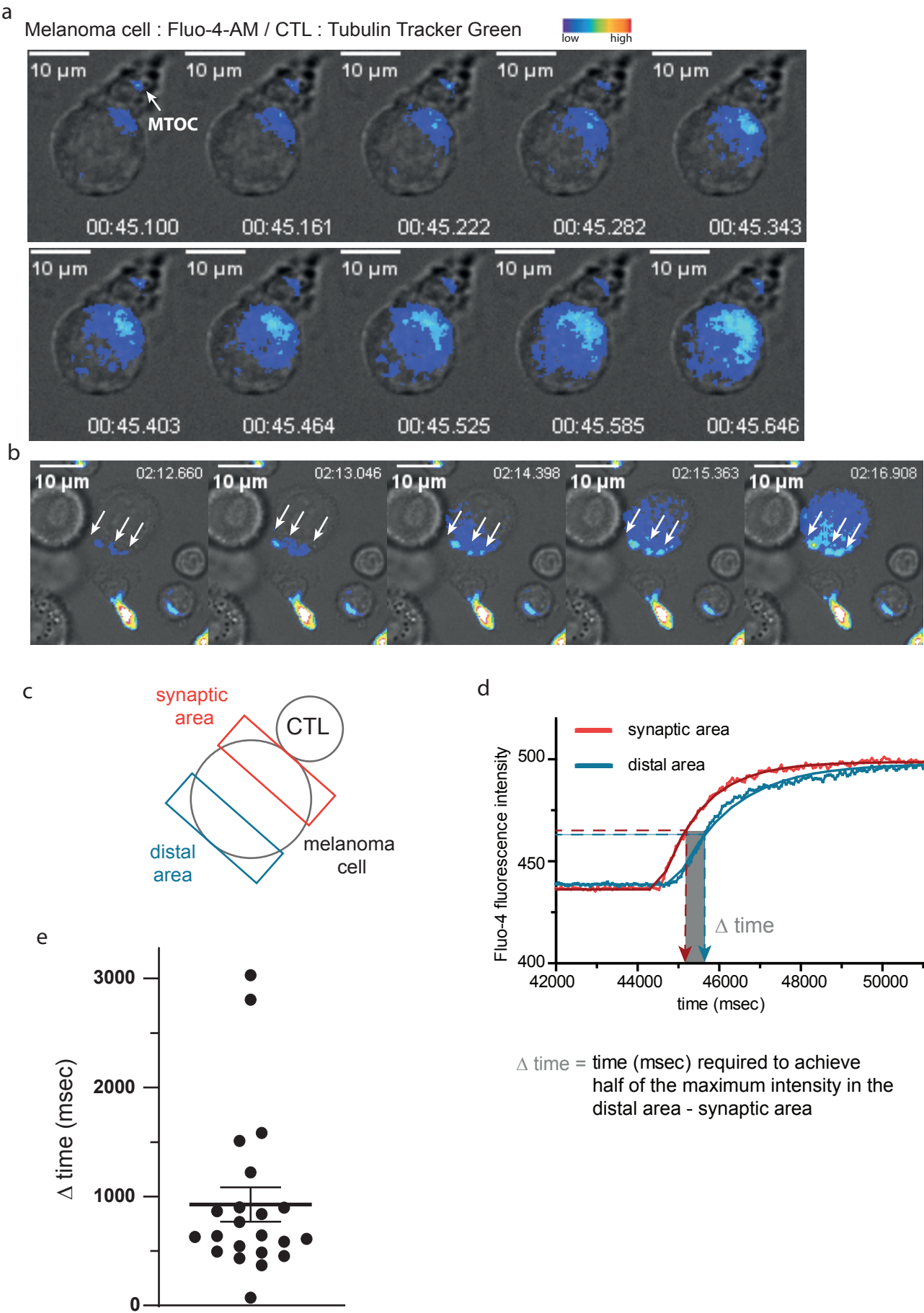
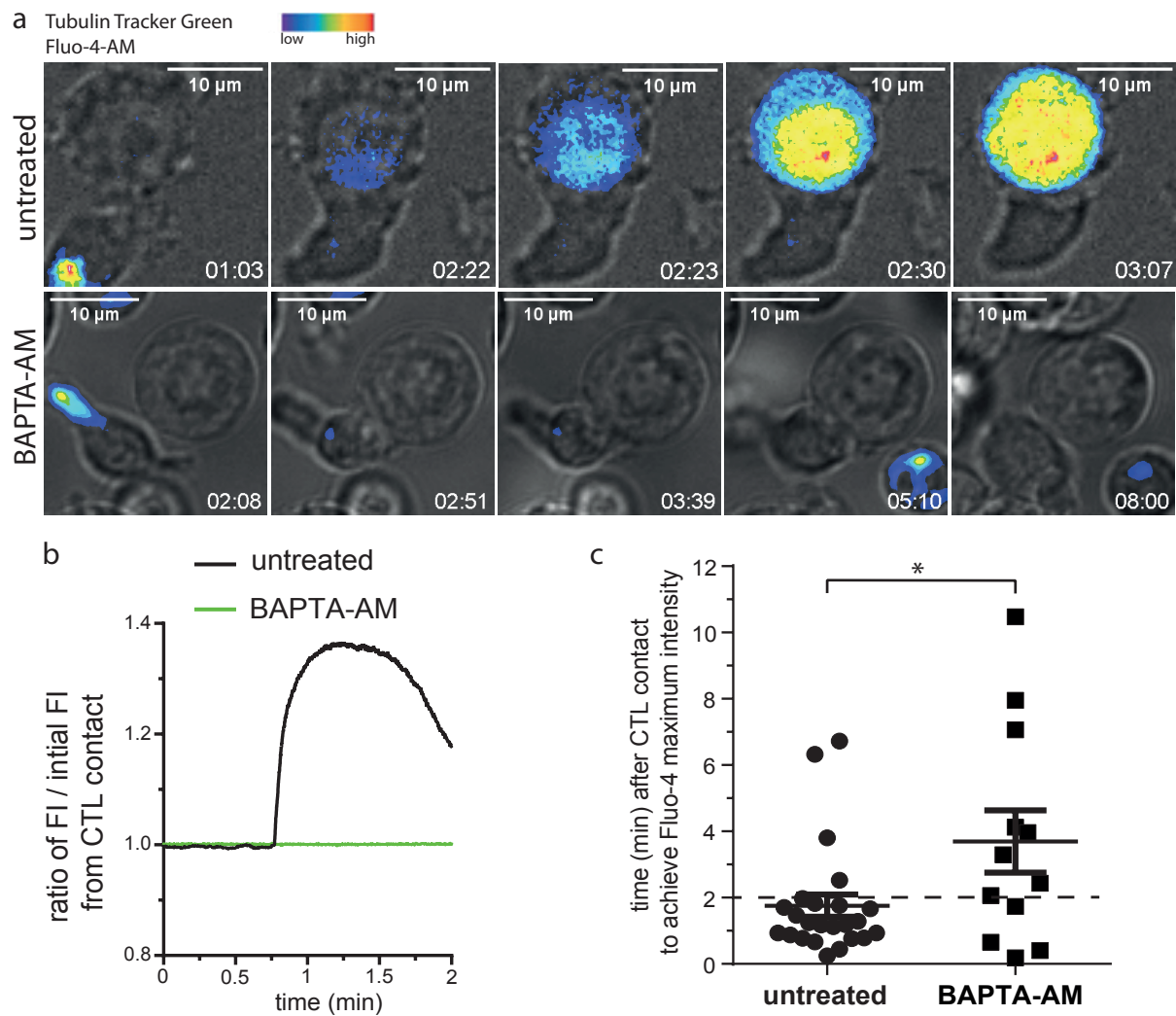
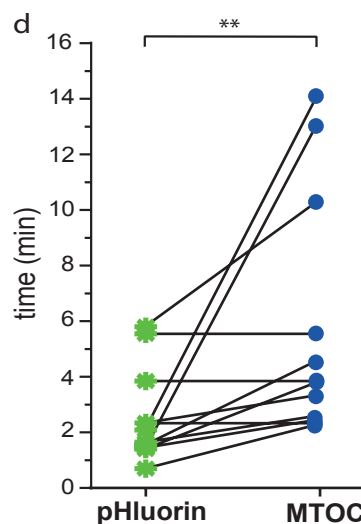
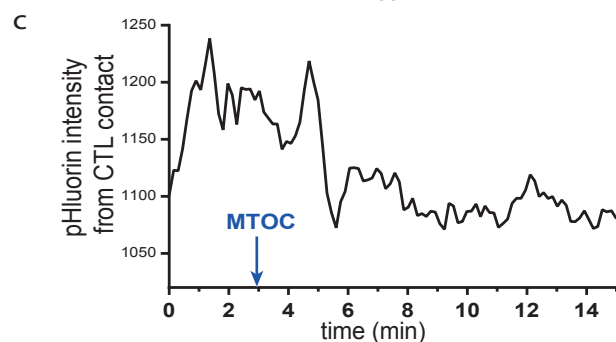
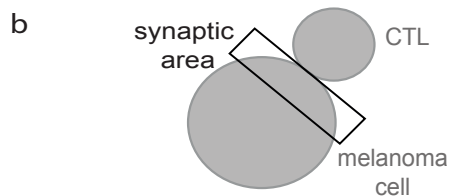
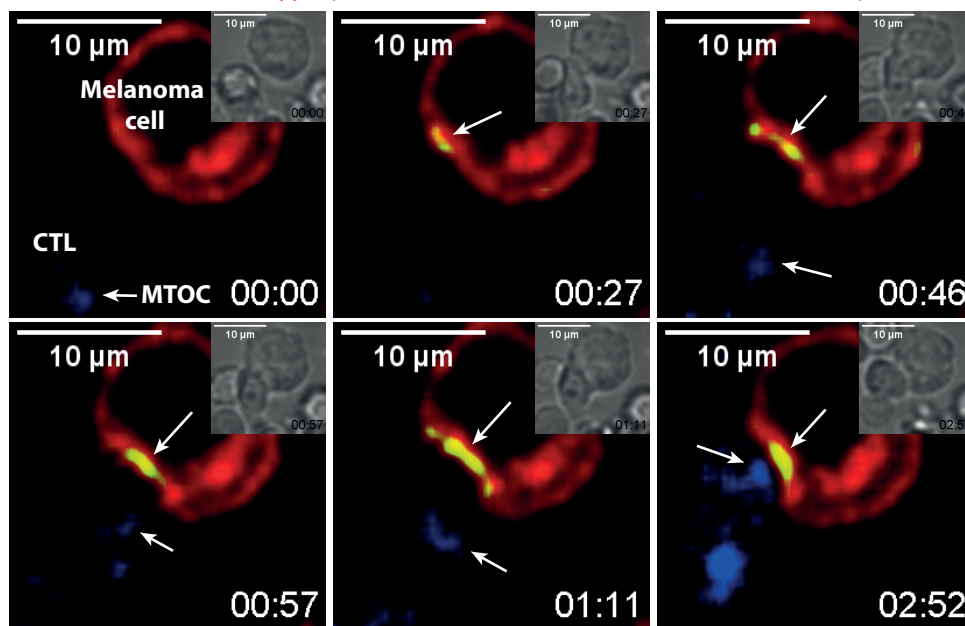


Figure 5



# Figure 6

a Melanoma cell : CD107a-mApple-pHluorin / CTL : Tubulin Tracker / In medium : Caspase-3 substrate



e Melanoma cell : CD107a-mApple-pHluorin / CTL : Tubulin Tracker  
In medium : Caspase-3 substrate

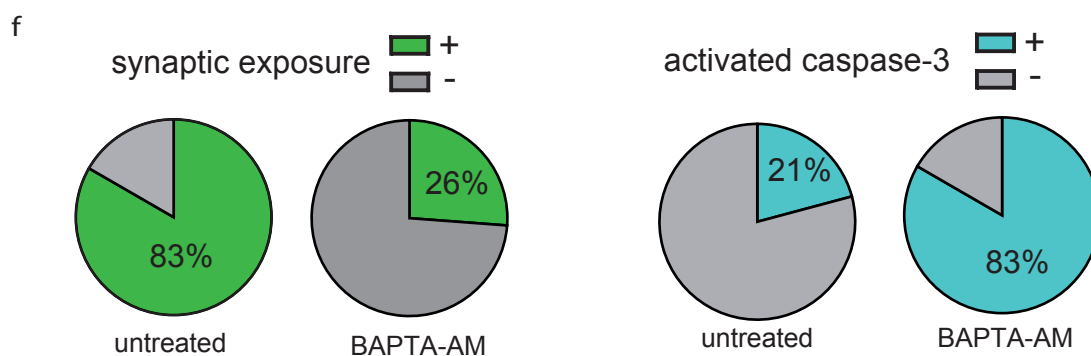
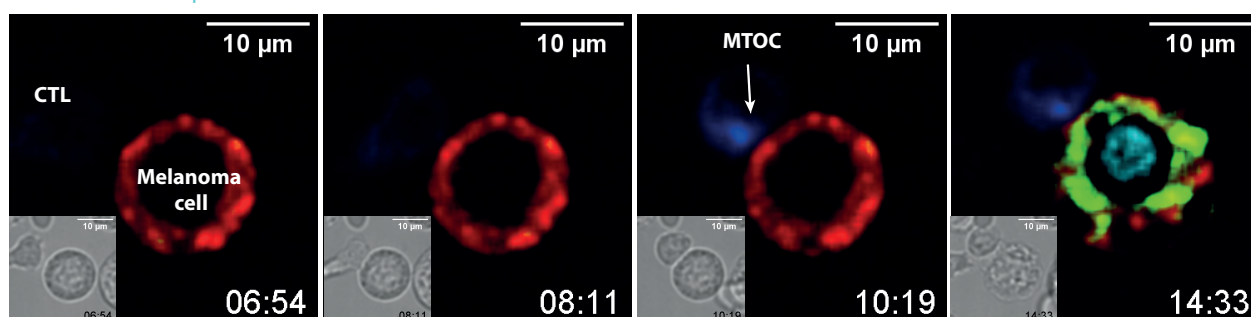
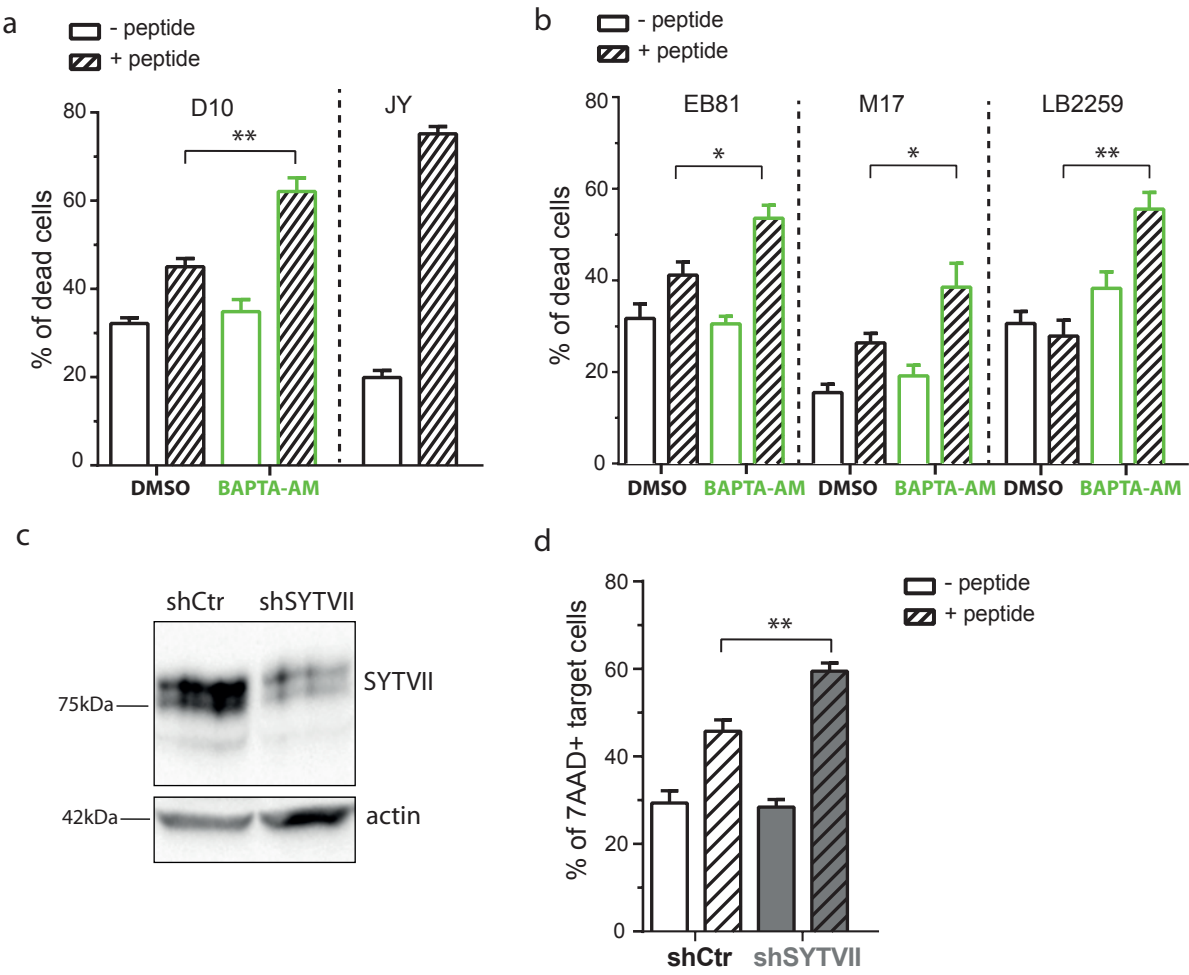
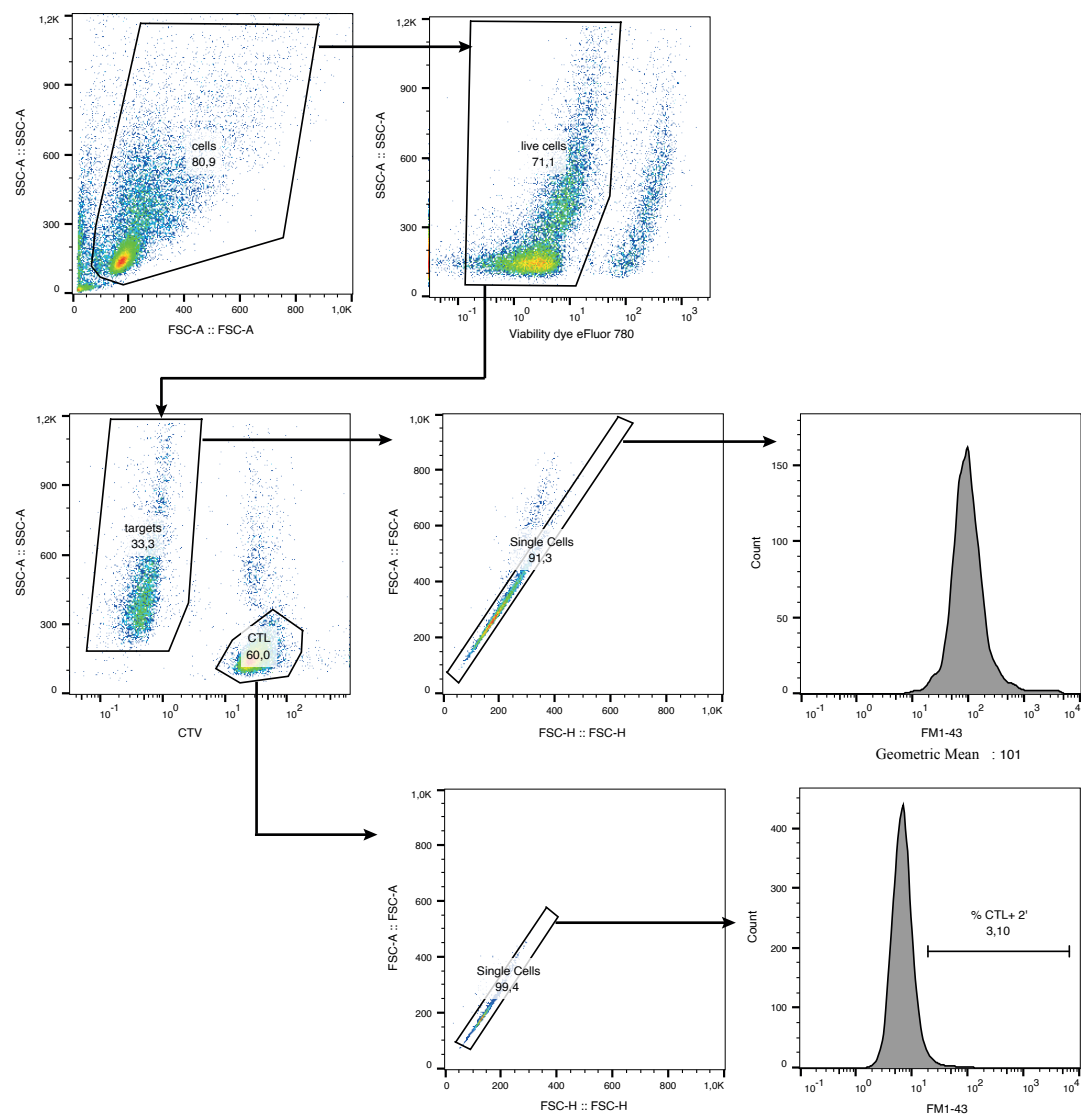




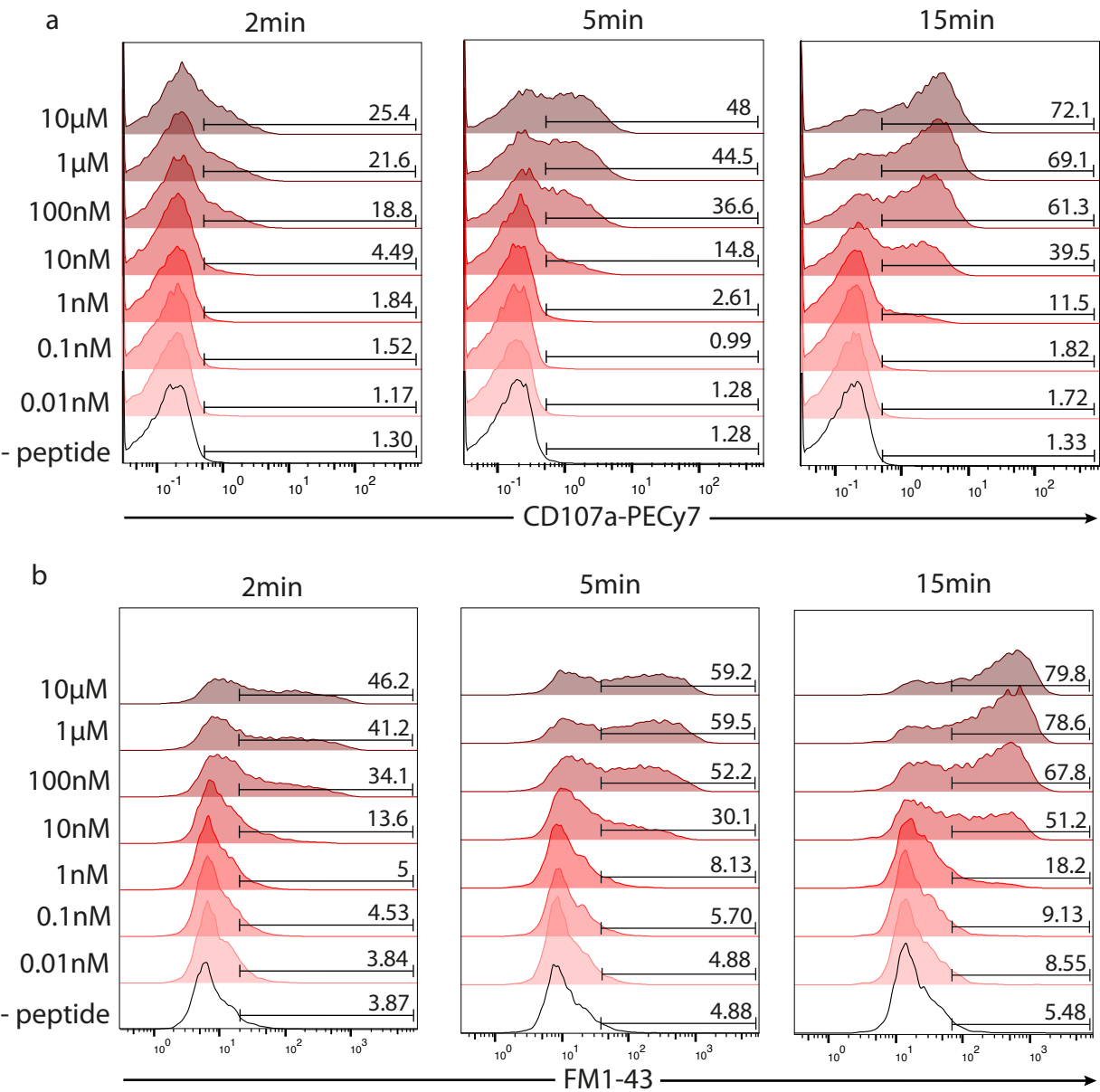
Figure 7



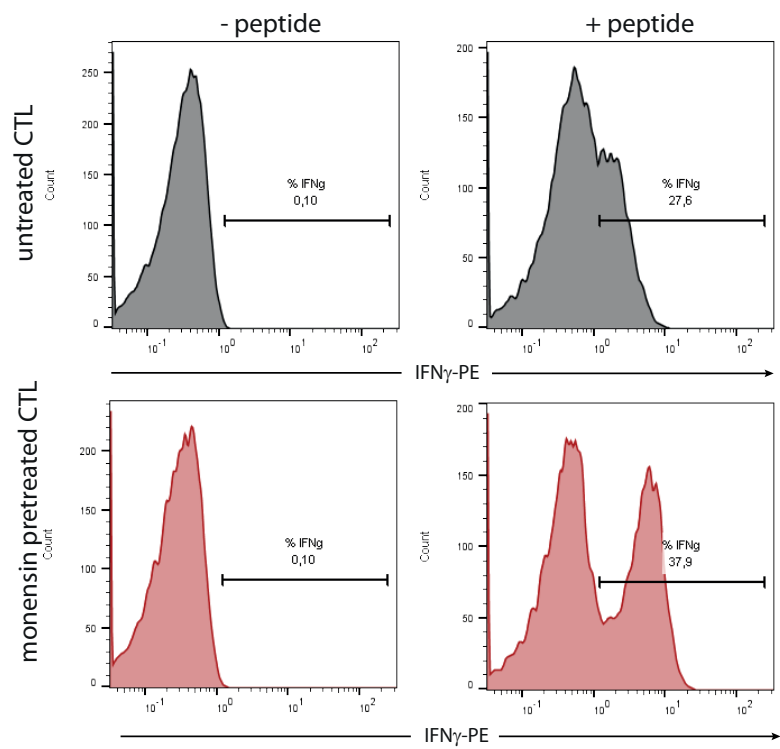
Supplementary Figure 1



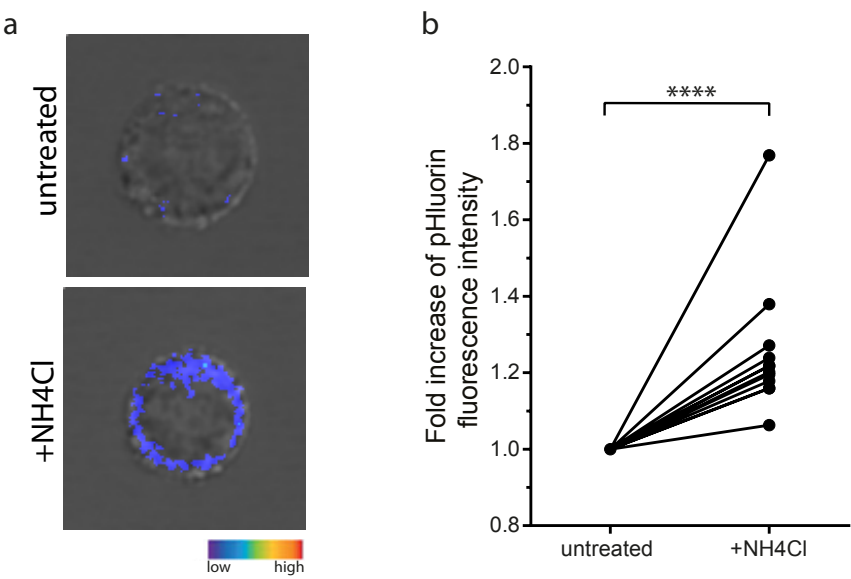
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

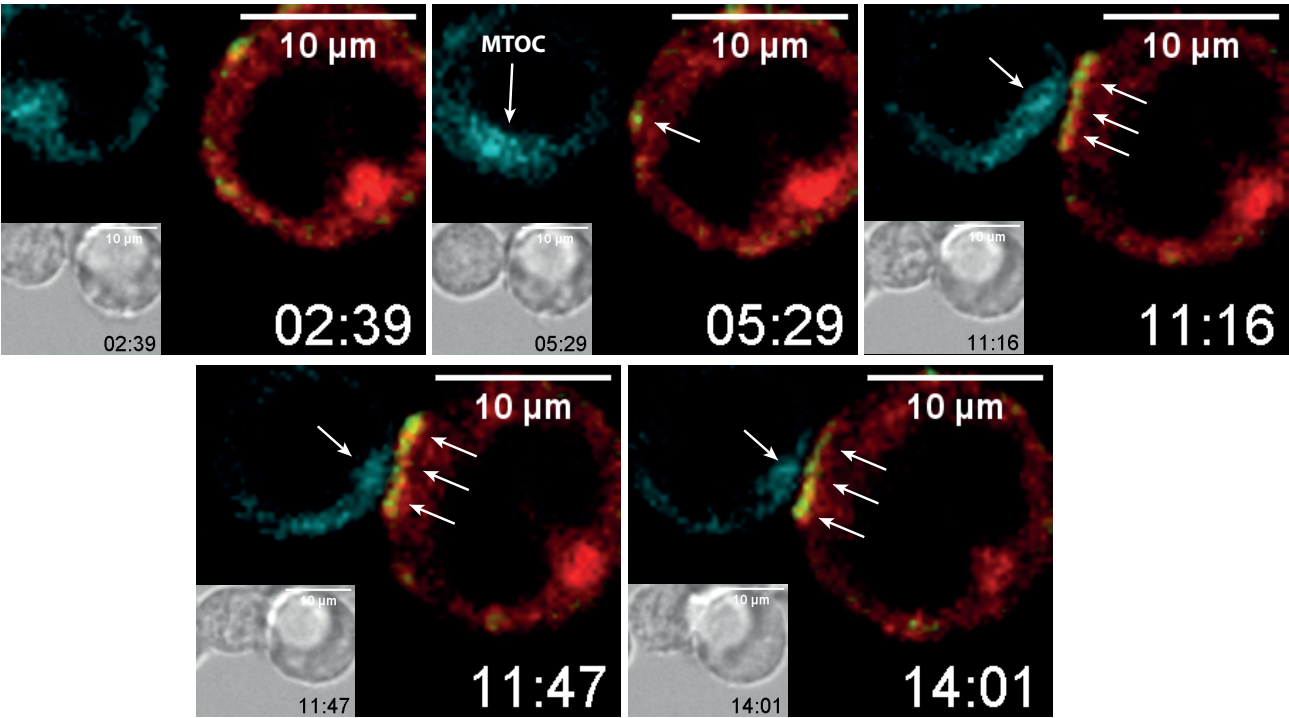


Supplementary Figure 4

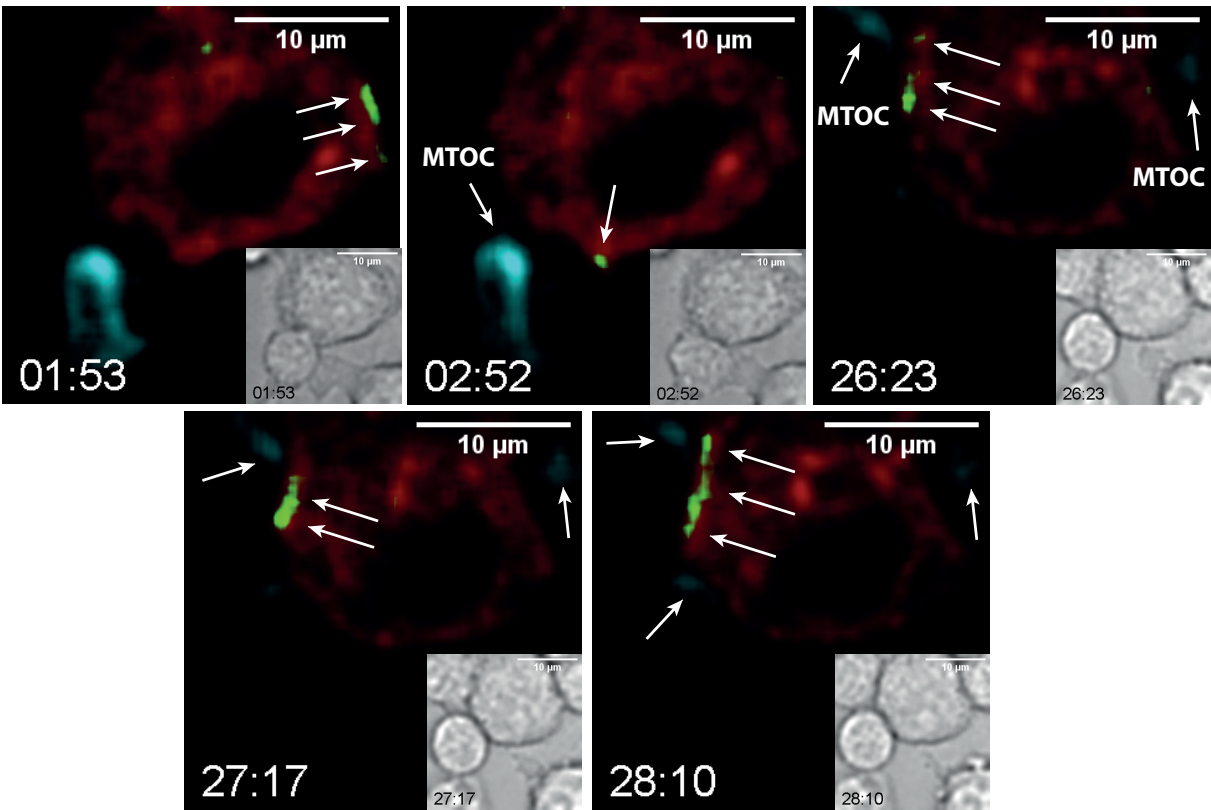


Supplementary Figure 5

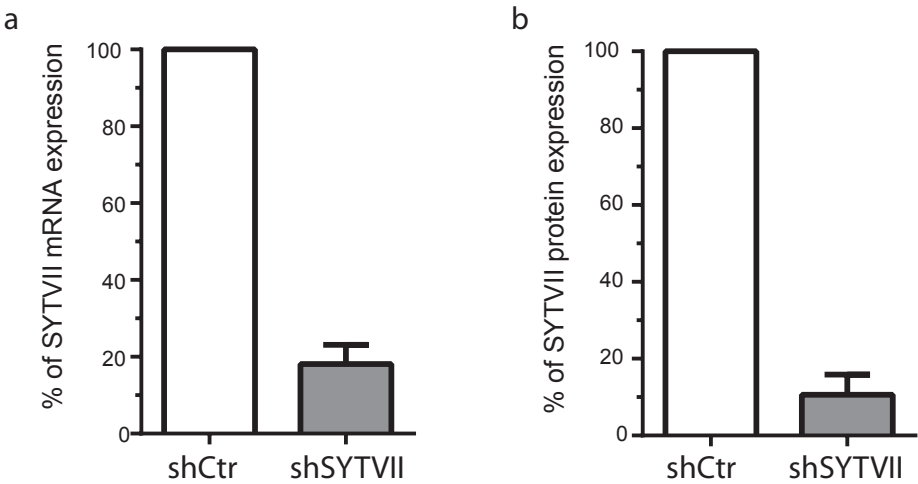
a Melanoma cell : CD107a-mApple-pHluorin / CTL : Tubulin Tracker



b



Supplementary Figure 6



### **III. RESULTATS**

#### **Partie 2 :**

#### **Données préliminaires et additionnelles au projet de recherche**



Dans cette partie seront retranscrites les données obtenues durant ma thèse qui répondent à des questions additionnelles au projet de recherche. Ces résultats seront donc présentés sous la forme de réponses parfois préliminaires aux diverses idées scientifiques. En effet, l'ensemble de ces travaux et des résultats précédents de l'équipe nous ont guidés vers l'étude du compartiment lysosomal comme le compartiment cellulaire essentiel à la défense des cellules de mélanome à la cytotoxicité des CTL induite par la voie de la perforine. De ces données découlent l'hypothèse selon laquelle, l'exocytose du compartiment lysosomal dans son ensemble serait impliqué dans ce phénomène. Ceci inclus : la quantité de lysosomes (la « masse lysosomale »), leur contenu en protéases et la rapidité de sécrétion des lysosomes dès les premières minutes de contact avec les CTL. Nous avons également cherché à déterminer si cette résistance est intrinsèque au lignage mélanocytaire ou partagée par d'autres tumeurs. L'objectif final étant d'étudier s'il est possible d'altérer la réponse sécrétoire des cellules de mélanome sans altérer le potentiel lytique des CTL qui utilisent des mécanismes de sécrétion similaires.

Cette partie se découpe en 3 axes de recherche :

**III. A) Le compartiment endo-lysosomal des cellules de mélanome**

1. Les cellules de mélanome sont enrichies en compartiment endolysosomal par rapport à des cellules sensibles
2. Altérer l'activité protéase des cellules de mélanome augmente leur sensibilité à la lyse des CTL
3. La cinétique de réponse des cellules de mélanome est très rapide
4. La résistance des cellules de mélanome est intrinsèque au lignage mélanocytaire
5. Etude du compartiment lysosomal dans des échantillons de patients atteints de mélanome métastatique

**III. B) La résistance des cellules de mélanome est-elle partagée par d'autres types de tumeur ?**

1. Les cellules de carcinome mammaire résistent à l'attaque des CTL
2. L'inhibition des protéases aspartiques

**III. C) Application de la méthode brevetée à l'analyse de l'activation des CTL et de leur potentiel lytique face à des cellules sensibles**

### **III. A) Le compartiment endo-lysosomal des cellules de mélanome**

L'ensemble de nos résultats place le compartiment lysosomal des cellules de mélanome au cœur de nos recherches sur la résistance à la cytotoxicité induite par la perforine. Les cellules utilisent des mécanismes de réparation membranaire très rapide pour se défendre de l'attaque des CTL. Cependant, comme décrits en introduction, les mécanismes de réparation membranaire sont partagés par différents types cellulaires. Nous avons ainsi essayé d'apporter des éléments de réponse supplémentaires aux travaux précédents pour comprendre quels mécanismes permettent aux cellules de mélanome d'avoir une meilleure capacité de réponse sécrétrice à l'origine de leur résistance comparée à d'autres types de cellules. Nous avons ainsi étudié 3 caractéristiques du compartiment endo-lysosomal : la « masse lysosomale », le contenu protéique et la vitesse de recyclage membranaire.

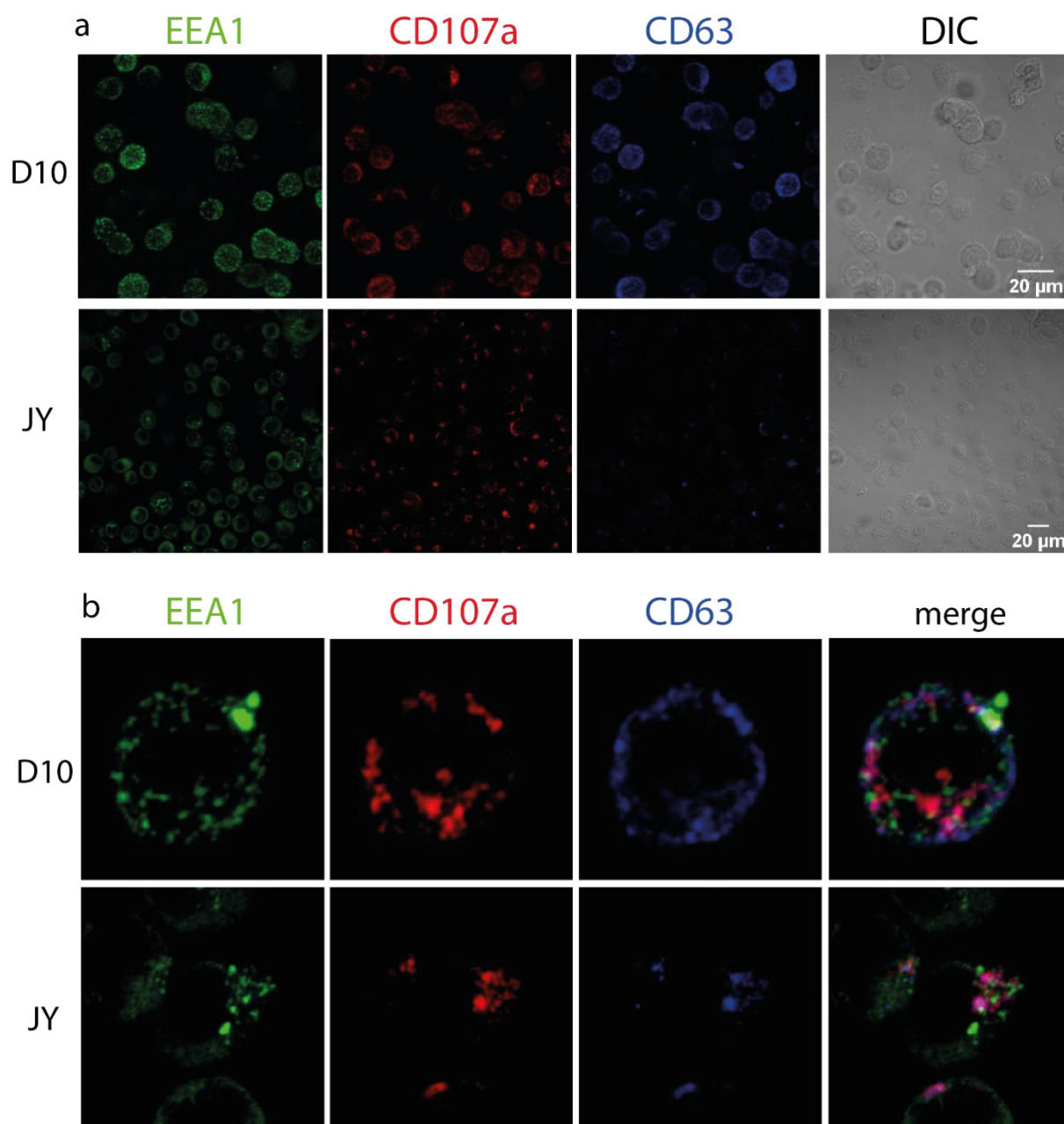
#### **1. Les cellules de mélanome sont enrichies en compartiment endolysosomal par rapport à des cellules sensibles**

Les cellules de mélanome (D10) et les cellules cibles conventionnelles sensibles à l'attaque des CTL (cellules JY) ont été marquées par immunofluorescence et analysées par microscopie confocale pour détecter 3 protéines du trafic vésiculaire :

- EEA1 (Early Endosome Antigen 1) : marqueur des endosomes précoces
- CD107a : marqueur des lysosomes
- CD63 : marqueur de vésicules intracellulaires

Une intensité de marquage plus forte est observée pour les 3 protéines dans les D10 comparée aux cellules JY (**Figure III.1**).

Ces données suggèrent une expression plus abondante de marqueur du trafic vésiculaire dans les cellules de mélanome.

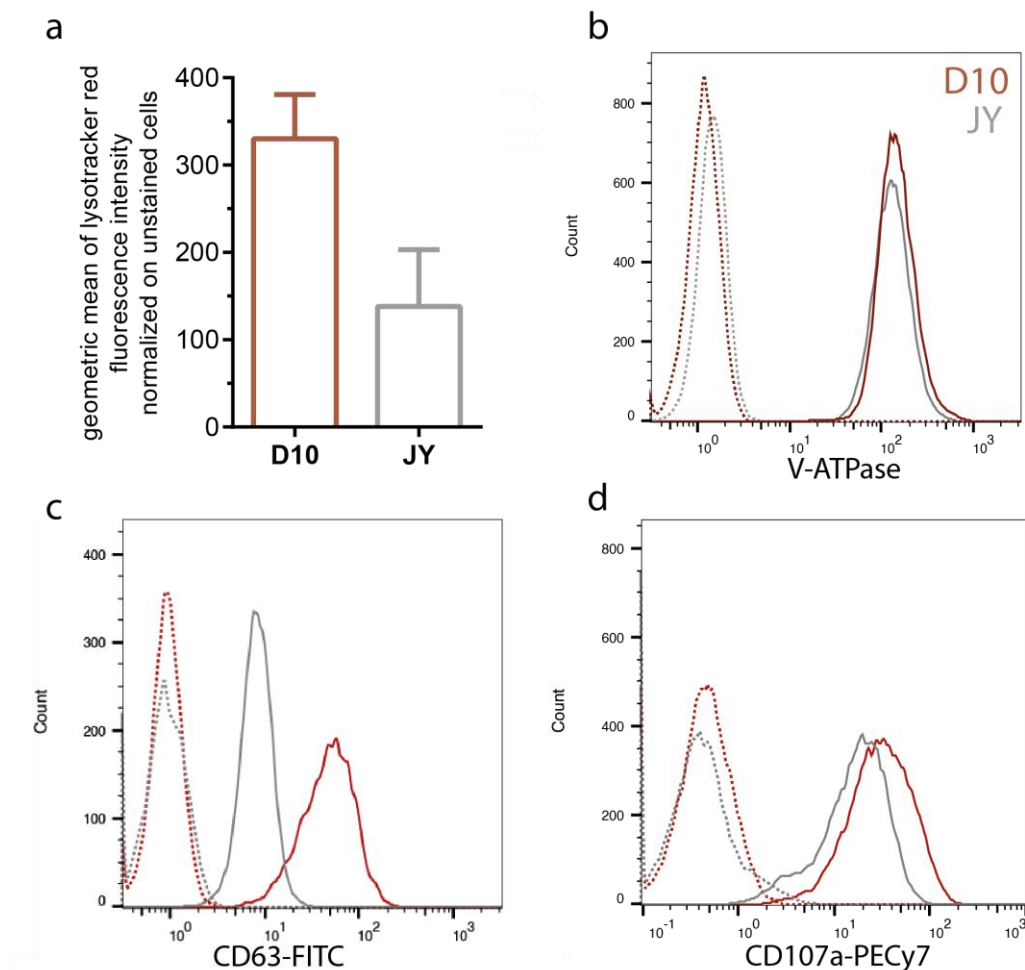


**Figure III.1 : Les cellules de mélanome sont enrichies en compartiment endolysosomal par rapport à des cellules sensibles à l'attaque des CTL. (a,b)** Les cellules de mélanome (D10) et cellules JY ont été fixées 10min dans une solution de PBS 4% PFA et perméabilisées dans une solution de PBS 3% BSA 0.01% saponine en présence des Ac primaires anti-EEA1, anti-CD107a et anti-CD63 durant 45min suivi par une incubation avec les Ac secondaires couplés respectivement à l'AlexaFluor 488, AlexaFluor 546, AlexaFluor 647. Les images ont été acquises au microscope confocale Zeiss 710 sur plusieurs plans focaux sommés sur le logiciel Image J pour avoir une représentation des marquages de la totalité des cellules et pas uniquement d'un seul plan (somme des z-stack).

Dans une seconde étape, nous avons analysé le compartiment vésiculaire acide des cellules de mélanome comparé à celui des cellules JY. Pour cela, les cellules ont été incubées 2h en présence d'1µM de lysotracker red, une sonde fluorescente dans les organites acides des cellules vivantes. Les intensités de fluorescence détectées par cytométrie en flux révèlent une internalisation de la sonde plus importante dans les D10 que dans les cellules JY (**Figure III.2a**). De façon similaire aux résultats obtenus par microscopie confocale, l'analyse de l'expression des marqueurs CD107a et CD63 par cytométrie en flux révèle que les cellules de mélanome expriment des niveaux de ces deux protéines à ceux des cellules JY (**Figure III.2 c et d**).

Nous avons pu également observer que cette acidité n'est pas directement corrélée à un niveau d'expression plus haut de la V-ATPase (**Figure III.2b**). La V-ATPase (vacuolar ATPase) se trouve à la membrane de certaines vésicules intracellulaires et permet le transport de protons dans les vésicules, un mécanisme essentiel au maintien d'un pH acide dans ces compartiments. Ces résultats montrent que son niveau d'expression n'est pas directement corrélé avec l'acidité importante du compartiment intracellulaire. En effet, cette pompe à proton est très versatile et subit une régulation importante de sa localisation et de son activité (Nishi and Forgac, 2002). Nous avons donc cherché à étudier une éventuelle relocalisation synaptique de la V-ATPase dans les cellules de mélanome mais nos résultats n'ont montré aucune modification de sa localisation suite à l'attaque des CTL. L'ensemble de ces données suggèrent que la V-ATPase n'est pas le facteur directement impliqué dans la « masse lysosomale » plus importante dans les cellules de mélanome que dans les cellules JY.

L'ensemble de ces données suggèrent une abondance de marqueurs du compartiment endo-lysosomal dans les cellules de mélanome qui est beaucoup moins marqué dans les cellules sensibles aux CTL (cellules JY). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la « masse lysosomale » pourrait être une propriété caractéristique de ce type de résistance perforine-dépendante.



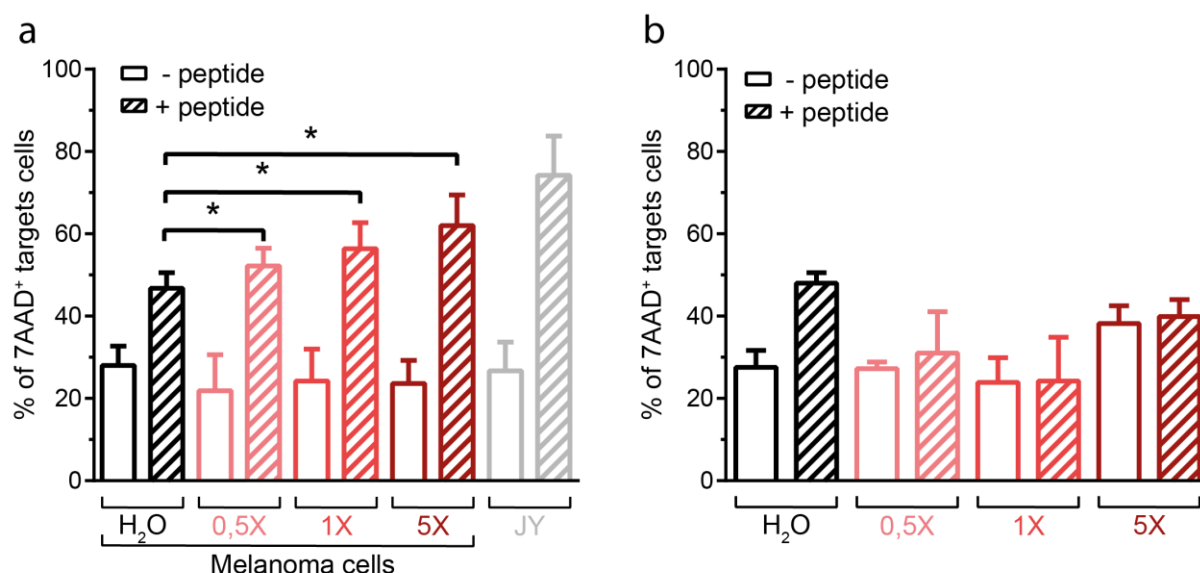
**Figure III.2 : Les cellules de mélanome sont enrichies en compartiment vésiculaire acide par rapport à des cellules sensibles à l'attaque des CTL. (a)** Les cellules de mélanome (D10) et cellules JY ont été incubées 2h avec 1 $\mu$ M de LysoTracker red en RPMI 5% FCS. La moyenne de fluorescence du lysoTracker red dans les D10 et les JY est représentée (n=3). **(b)** Les cellules de mélanome (D10) et cellules JY ont été fixées 10min dans une solution de PBS 4% PFA et perméabilisées dans une solution de PBS 3% BSA 0.01% saponine en présence de l'Ac anti-V-ATPase suivi par une incubation avec l'Ac secondaires couplé à l'AlexaFluor 488 **(c et d)** ou avec les Ac directement couplés anti-CD63 FITC et anti-CD107a PECy7. **(b-d)** Les résultats sont typiques de 3 expériences indépendantes.

## 2. Altérer l'activité protéase des cellules de mélanome augmente leur sensibilité à la lyse des CTL

La première approche utilisée pour altérer les protéases des cellules de mélanome a été une approche globale visant à bloquer un maximum de famille de protéases pour déterminer quel est le niveau d'implication des protéases dans la résistance des cellules de mélanome. Sont-elles les acteurs majeurs de la défense des cellules de mélanome ?

Nous avons donc tout d'abord utilisé un cocktail d'inhibiteurs de protéases ciblant plusieurs grandes familles de protéases (**Table 1**). Les cellules de mélanome ont été prétraitées avec différentes concentrations de ce cocktail durant 2h (en présence ou absence du peptide antigénique) puis lavées et conjuguées avec les CTL. On observe une augmentation en moyenne de 15% de la sensibilité des cellules de mélanome à l'attaque des CTL lorsque la concentration d'inhibiteurs de protéases est la plus élevée (**Figure III.3a**). De plus, les conditions en absence de peptide antigénique nous indiquent que le cocktail d'inhibiteur n'est pas toxique pour les cellules de mélanome.

L'objectif étant d'altérer la défense des cellules de mélanome durant l'attaque des CTL sans altérer leur capacité lytique nous avons dans une seconde étape non pas prétraités les cellules de mélanome avant l'ajout des CTL mais ajouter le cocktail d'inhibiteurs de protéases durant les 4h de formation de conjugués. Dans ce cas, on observe d'une part que le cocktail d'inhibiteurs de protéases n'a plus d'effet sur la mortalité des cellules de mélanome suite à l'attaque des CTL. D'autre part, l'activité cytotoxique des CTL est complètement inhibée (**Figure III.5b**). Ce cocktail d'inhibiteurs altère donc l'activité lytique des CTL. Au vu de la composition du cocktail d'inhibiteurs, nous pouvons suggérer que sa teneur en inhibiteurs de sérines protéases (famille des granzymes) altère l'activité lytique des CTL.



**Figure III.3 : Le prétraitement des cellules de mélanome par un cocktail d'inhibiteurs de protéases augmente leur sensibilité à l'attaque des CTL. (a,b)** Les cellules de mélanome (D10) ou cellules cibles conventionnelles (JY) ont été préchargés avec le peptide antigénique durant 2h et lavées avant l'ajout des CTL durant 4h. **(a)** Différentes concentrations du cocktail d'inhibiteurs de protéases ont été ajoutées avec les D10 durant les 2h d'incubation

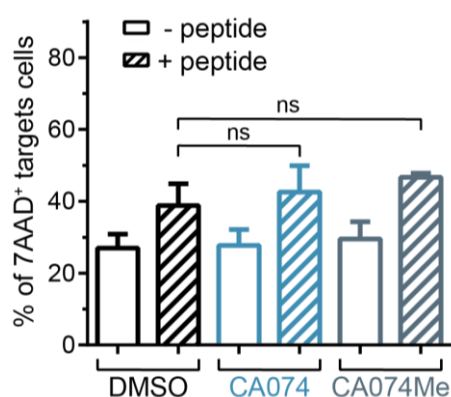
avec le peptide antigénique puis lavées avant l'ajout des CTL. **(b)** Le cocktail d'inhibiteur a été ajouté durant les 4h de contact CTL-cellules de mélanome. Le pourcentage de cellules cibles 7-AAD positives est représenté. Les résultats de 6 expériences sont présentés et les différences statistiques ont été calculées avec le logiciel GraphPad Prism par un test Wilcoxon. \* $p < 0,05$

| Name                        | reference   | inhibition                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aprotinin</b>            | 10236624001 | serine proteases inhibitor                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Bestatin</b>             | 10874515001 | inhibitor of leucine aminopeptidase, aminopeptidase B, and triamino peptidase                                                                                                                                                                              |
| <b>Calpain Inhibitor I</b>  | 11086090001 | strong, competitive inhibitor of the $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral cysteine proteases calpain I and calpain II                                                                                                                                       |
| <b>Calpain Inhibitor II</b> | 136632-32-1 | Shows marked inhibition of cathepsin B                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Chymostatin</b>          | 11004638001 | Chymostatin is a strong inhibitor of many proteases, including chymotrypsin, papain, chymotrypsin-like serine proteinases, chymases, and lysosomal cysteine proteinases such as cathepsins A,B,C, B, H, and L. It weakly inhibits human leucocyte elastase |
| <b>E-64</b>                 | 66701-25-5  | effective ligand for affinity purification of cysteine proteases                                                                                                                                                                                           |
| <b>Leupeptin</b>            | 103476-89-7 | Inhibitor of serine and cysteine proteases                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>alpha2-macroglobulin</b> | SRP6314     | irreversible inhibitor of a variety of proteinases                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Pefabloc SC</b>          | 11429868001 | a specific, potent, and irreversible inhibitor of serine proteases                                                                                                                                                                                         |
| <b>Pepstatin</b>            | 10253286001 | potently inhibits the HIV protease and other aspartic proteases, such as pepsin, renin, cathepsin D, chymosin, protease B from <i>Aspergillus niger</i> , and acid proteases of microbial origin                                                           |
| <b>PMSF</b>                 | 10837091001 | PMSF (C7H7O2SF) inhibits serine proteases such as chymotrypsin, trypsin, thrombin, and the cysteine protease papain                                                                                                                                        |
| <b>TLCK</b>                 | 4272-74-6   | Blocks apoptosis in cell lines by inhibiting the processing of caspases in some cell lines and to some stimuli                                                                                                                                             |
| <b>trypsin inhibitor</b>    | 10109878001 | an inhibitor for trypsin, plasmin and plasma kallikrein activity in serum-free cell-culture media                                                                                                                                                          |
| <b>trypsin inhibitor</b>    | 10109886001 |                                                                                                                                                                                                                                                            |

**Table 1 : Liste des inhibiteurs de protéases contenus dans le cocktail et leur spécificité.** Les inhibiteurs des sérines protéases sont surlignés.

Nous avons donc restreint la stratégie d'inhibition de l'activité protéase sur une cible en particulier, la cathepsine B. Les travaux précédents de l'équipe ont permis d'identifier la perforine comme un substrat de la cathepsine B (Khazen et al., 2016). Nous avons donc émis l'hypothèse que la cathepsine B est une cible moléculaire qui pourrait permettre d'altérer spécifiquement la résistance des cellules de mélanome durant l'attaque des CTL et sans en

altérer le potentiel lytique. Pour cela, et toujours dans le but de trouver un inhibiteur de protéase qui n'altère pas l'activité cytotoxique des CTL, nous avons utilisé deux inhibiteurs de la cathepsine B qui ont été ajoutés pendant la formation des conjugués durant 4h. Le CA074 est imperméable aux cellules permettant d'inhiber la cathepsine B sécrétée et le CA074Me est perméable et permet donc d'inhiber la cathepsine B intracellulaire. Ces 2 traitements n'ont pas permis d'augmenter la sensibilité des cellules de mélanome à l'attaque des CTL (**Figure III.6**). Ces résultats suggèrent l'implication d'autres protéases dans ce phénomène comme l'indique les résultats précédents obtenus avec le cocktail d'inhibiteurs de protéases. Ces conclusions sont mesurées car nous n'avons pas vérifié la fonctionnalité de cet inhibiteur par des tests *in vitro* de l'activité des protéases et notamment de la cathepsine B des cellules de mélanome suite au traitement. Cette stratégie est en cours de développement dans l'équipe afin de récupérer les lysosomes des cellules de mélanome et tester différents inhibiteurs de protéases sur l'activité de celles spécifiquement exprimées par les cellules de mélanome.



**Figure III.4 : L'inhibition de la cathepsine B durant l'attaque des cellules de mélanome par les CTL n'a pas d'effet sur la cytotoxicité.** 10μM des inhibiteurs CA074 ou CA074Me en milieu RPMI 5%FCS ont été ajoutés durant les 4h de contact CTL-cellules de mélanome. Le % de cellules de mélanome 7-AAD positives est représenté. Les résultats de 4 expériences sont présentés et les différences statistiques ont été calculé avec le logiciel GraphPad Prism par un test Wilcoxon. *ns=non significatif*

Ces résultats nous indiquent que les protéases pourraient constituer d'intéressantes cibles moléculaires dans le but d'altérer la sensibilité des cellules de mélanome à l'attaque des CTL. Cependant, nos données en accord avec la littérature (bien que parfois controversée) soutiennent le rôle essentiel des protéases à l'activité lytique des CTL (Balaji et al., 2002; Bots and Medema, 2006; Konjar et al., 2010). De plus, une seule protéase ne semble pas



impliquée dans la résistance des cellules de mélanome. En effet, l'augmentation de la sensibilité des cellules de mélanome suite au prétraitement par un cocktail d'inhibiteurs de plusieurs familles de protéases en présence de sérum (**Figure III.3**), et suite au prétraitement par E64d (inhibiteur de calpaïnes, cathepsine B, H et L) et l'inhibiteur de cathepsins III (inhibiteur des cathepsines B, H et L) en absence de sérum (Khazen et al., 2016), soulèvent la difficulté à inhiber les protéases des cellules de mélanome durant l'attaque des CTL et dans un milieu de culture contenant du serum. L'ensemble de ces résultats permettent aussi de suggérer l'implication de plusieurs protéases dans la résistance des cellules de mélanome à l'attaque des CTL. Afin d'affiner cette liste potentielle et surtout d'analyser s'il existe des protéases différentes ou surexprimées dans les cellules de mélanome par rapport aux CTL, nous avons démarré par une approche de spectrométrie de masse la caractérisation du contenu protéique des lysosomes de ces deux populations cellulaires comparées également aux lysosomes de cellules sensibles à l'attaque des CTL. Cette approche nécessite une purification des lysosomes par ultracentrifugation qui a pu être mise au point et permettra une caractérisation du contenu protéique dans ce compartiment vésiculaire. Ces données permettront de tester par une approche globale puis ciblée l'inhibition d'une ou plusieurs protéases durant l'attaque des CTL.

### **3. La cinétique de réponse des cellules de mélanome est très rapide**

Nous avons pu démontrer par une approche de vidéomicroscopie la rapidité et la localisation de l'exposition à la membrane plasmique des lysosomes dès cellules de mélanome dès les premières minutes de contact avec les CTL. Nous avons ici émis l'hypothèse que cette réponse sécrétrice rapide et localisée corrèle avec une activation du recyclage membranaire également très rapide. En effet, en plus de la « masse lysosomale », de la nécessité de l'activité protéase, nous nous sommes interrogés sur la valeur de la rapidité de la réponse des cellules de mélanome et son éventuelle corrélation avec la résistance à l'attaque des CTL. Pour cela, nous avons mathématiquement étudié différents paramètres des courbes de recyclage membranaire des cellules de mélanome ainsi que ceux des cellules sensibles à l'attaque des CTL (cellules JY).

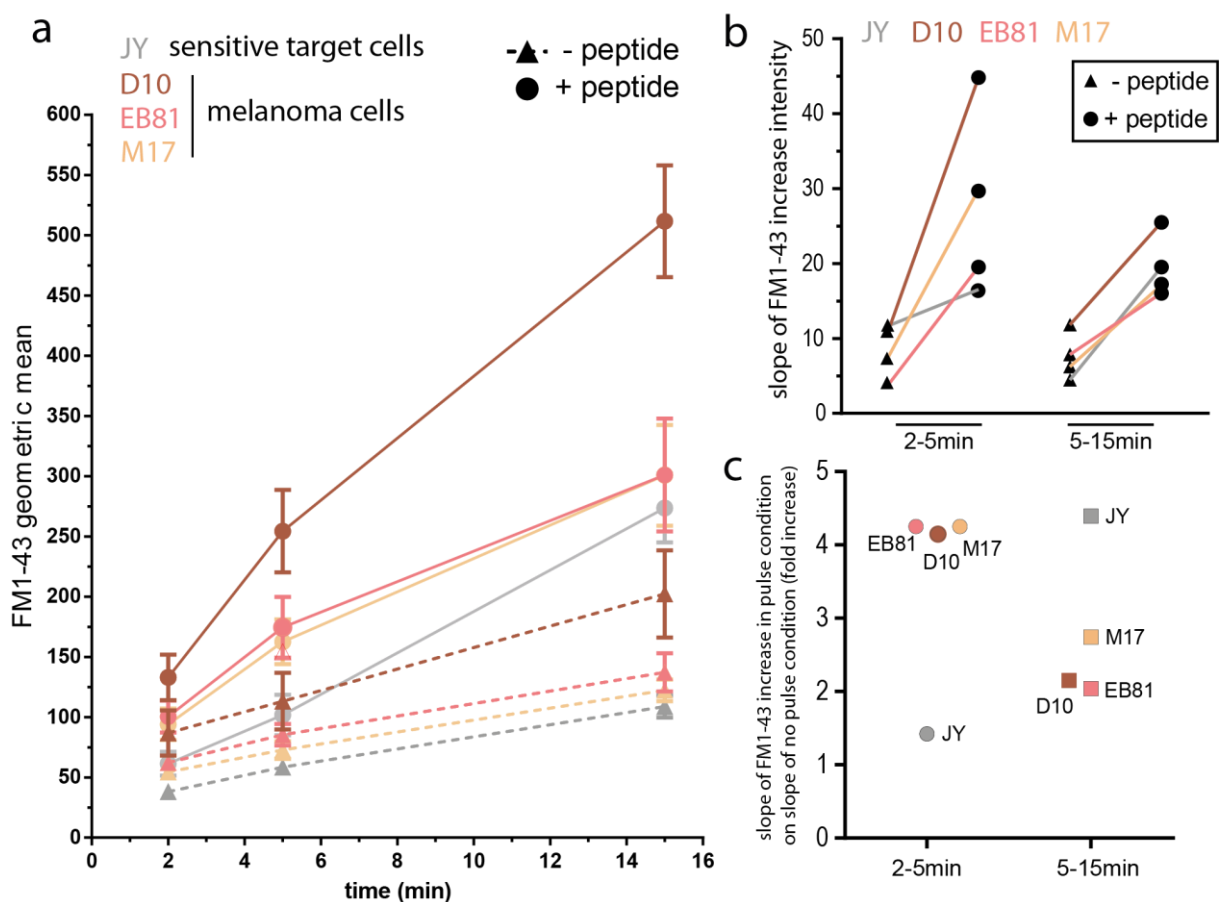
Le recyclage membranaire de 3 lignées de cellules de mélanome résistantes à l'attaque des CTL et celui des cellules JY au cours de 15min de contact avec mes CTL est présenté **Figure III.5a**. Les cellules cibles ont été préalablement chargées ou non avec le peptide antigénique.

Tout d'abord, comme préalablement décrits, ces données montrent une augmentation du turnover membranaire des cellules cibles après l'attaque des CTL. De façon intéressante, les cellules JY semblent répondre plus faiblement que les cellules de mélanome. Nous avons donc cherché à étudier ce paramètre plus spécifiquement afin de déterminer si le niveau de recyclage membranaire pourrait être une caractéristique qui corrèle avec le niveau de résistance des cellules cibles.

Nous avons calculé les pentes d'augmentation du recyclage membranaire entre 2 et 5min de contact et entre 5 et 15min de contact cellulaire. Les résultats obtenus sont comparés selon les conditions en présence ou en absence de peptide antigénique (**Figure III.5b**). Pour les 3 lignées de cellules de mélanome et pour les cellules JY, l'attaque des CTL déclenche une augmentation de ces pentes que l'on peut traduire par une augmentation de la vitesse du recyclage membranaire. Toutes les cellules sont donc capables de répondre à l'attaque des CTL.

Cependant, nous pouvons observer que la capacité à augmenter le recyclage membranaire suite à l'attaque des CTL (en présence du peptide antigénique) par rapport à l'augmentation basale du recyclage membranaire (en absence du peptide antigénique) semble différente pour les JY comparé aux cellules de mélanome. En effet, l'augmentation de la vitesse du recyclage membranaire des cellules JY suite à l'attaque des CTL comparé à leur recyclage membranaire basal est relativement faible entre 2 et 5 min de contact comparé à celles des cellules de mélanome (**Figure III.5b**). Afin de calculer ce paramètre et dans le but de s'affranchir du niveau basal du recyclage membranaire, nous avons normalisé la pente du recyclage membranaire de chaque lignée due à l'attaque des CTL (condition + peptide) par rapport à l'augmentation basale du recyclage membranaire due à l'activité membranaire intrinsèque à chaque lignée (condition – peptide) (**Figure III.5c**). De façon intéressante, la capacité à augmenter le recyclage membranaire (par rapport à leur niveau basal) des cellules de mélanome est environ 4 fois plus importante dans les premières minutes de contact. Cependant, pour les cellules JY on observe une augmentation uniquement d'un facteur d'environ 1,5. Entre 5 et 15min, la tendance s'inverse : les cellules de mélanome semblent s'être rapidement stabilisées avec une augmentation du recyclage membranaire qui diminue à un facteur 2 alors que pour les cellules JY l'augmentation atteint un facteur 4 (**Figure III.5c**).

Ces données suggèrent que les cellules de mélanome sont capables d'activer et d'augmenter leur recyclage membranaire beaucoup plus rapidement que des cellules sensibles à l'attaque des CTL (entre 2 et 5min après le contact). Les cellules sensibles à l'attaque des CTL sont également capables d'augmenter leur activité membranaire mais il semblerait qu'elles nécessitent plus de temps. Ces données sont particulièrement intéressantes à corréler avec les résultats présentés en partie 1 qui démontrent la capacité des cellules de mélanome à répondre à l'attaque des CTL dès les premières minutes de contact, avant même la polarisation complète de la machinerie lytique des CTL.

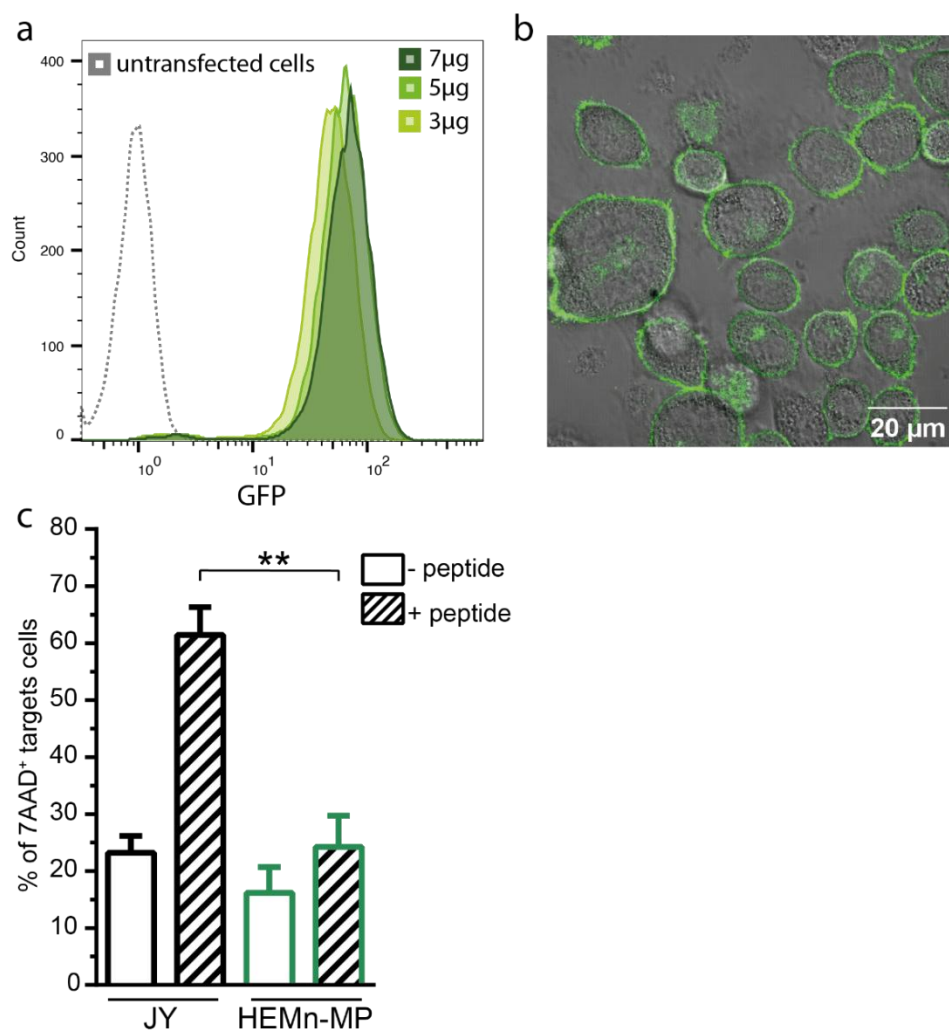


**Figure III.5 : L'augmentation du recyclage membranaire des cellules de mélanome est plus rapide par rapport à des cellules sensibles à l'attaque des CTL.** Les cellules cibles ont été préalablement chargées avec le peptide antigénique et conjuguées avec les CTL spécifiques de ce peptide durant 2, 5 et 15min. **(a)** Durant la formation des conjugués CTL-cellules cibles, 10µg/ml de FM1-43 ont été ajoutés dans le milieu de culture et la fluorescence de FM1-43 analysée dans les cellules cibles est représentée. **(b)** La pente de chaque courbe obtenue en absence ou en présence de peptide antigénique en **(a)** a été calculée entre 2 et 5 min de contact et entre 5 et 15 min de contact. **(c)** Les ratio des pentes calculées en **(b)** en condition présence de peptide / pente en condition absence de peptide ont été calculé. Ces données représentent la capacité à augmenter le recyclage membranaire des cellules normalisée par rapport à leur capacité basale.

#### 4. La résistance des cellules de mélanome est intrinsèque au lignage mélanocytaire

Une question majeure de ce projet fut de déterminer si la propriété de résistance par sécrétion lysosomale des cellules de mélanome est intrinsèque au lignage mélanocytaire ou acquise durant la transformation tumorale. Pour cela, nous avons adapté une lignée de mélanocytes humains (HEMn-MP) à notre modèle cellulaire de reconnaissance CTL-cellule cible par l'induction de l'expression de la molécule HLA-A2 couplée à l'expression de la GFP. Les mélanocytes ont été électroporées en présence de différentes concentrations d'ARNm codant pour cette construction. L'expression de la protéine HLA-A2 a été analysée par la fluorescence de la GFP par cytométrie en flux (**Figure III.6a**) et sa localisation à la membrane plasmique a été vérifiée par microscopie confocale (**Figure III.6b**). Les données ne sont pas présentées ici mais nous avons également vérifié l'activation des CTL face aux mélanocytes transfectés pré-incubés en présence ou absence du peptide antigénique par l'exposition de CD107a à la surface des CTL. Ces résultats ont indiqué une activation des CTL similaire à celle obtenue face aux cellules cibles conventionnelles (cellules JY). Le modèle cellulaire a donc été adapté.

Les mélanocytes exprimant HLA-A2 chargés avec le peptide antigénique ont été conjugués 4h avec les CTL et le pourcentage de cellules 7-AAD<sup>+</sup> est analysé. Ces expériences révèlent une forte résistance des mélanocytes à l'attaque des CTL comparé aux cellules cibles conventionnelles (**Figure III.6c**). Ces données suggèrent que la résistance des cellules de mélanome à l'attaque des CTL est intrinsèque au lignage mélanocytaire. La fonction majeure des mélanocytes est de sécréter la mélanine, un pigment contenu dans des vésicules spécialisées appelées les mélanosomes appartenant à la famille des « organites associés aux lysosomes ». Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les cellules de mélanome ont détournée des propriétés intrinsèques au lignage mélanocytaire pour résister à l'attaque des CTL.



**Figure III.6 : Les mélanocytes humains résistent à l'attaque des CTL.** **(a)** Les cellules HEMn-MP ont été électroporées avec différentes concentrations d'ARNm codant pour HLA-A2 couplée à la GFP. L'expression de la GFP a été analysée par cytométrie en flux. **(b et c)** Les cellules HEMn-MP électroporées avec 5µg d'ARNm codant pour HLA-A2 couplé à la GFP. **(b)** Image de microscopie confocale des HEMn-MP électroporées. **(c)** Les HEMn-MP électroporées avec l'ARNm d'intérêt, ou les cellules JY ont été conjugués 4h avec les CTL préalablement marqués au CTV et le pourcentage de cellules cibles 7-AAD<sup>+</sup> est représenté. Les résultats de 4 expériences sont présentés et les différences statistiques ont été calculées avec le logiciel GraphPad Prism par un test de Mann-Whitney. \*\* $p < 0,001$ .

## 5. Etude du compartiment lysosomal dans des échantillons de patients atteints de mélanome métastatique

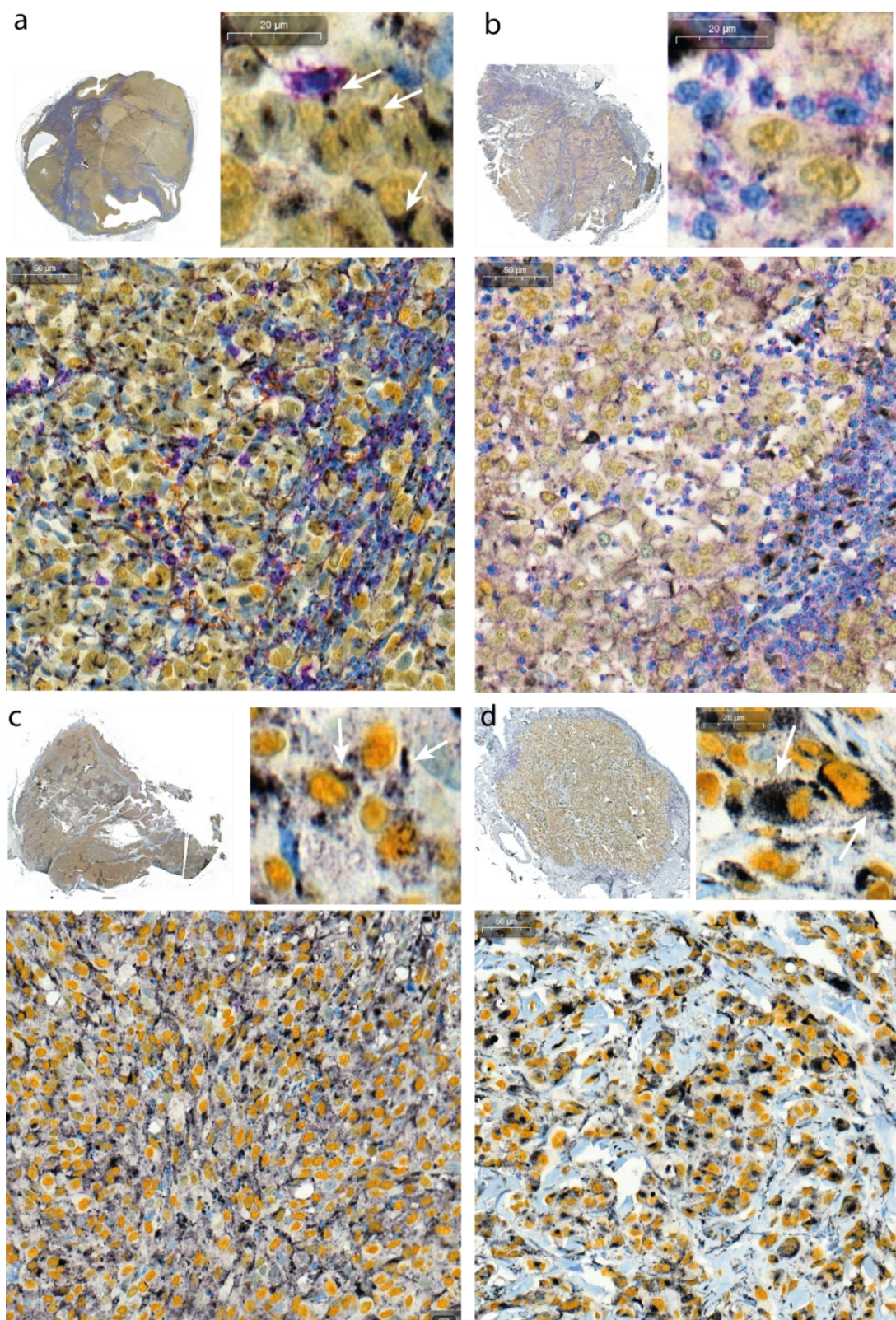
Grâce à une collaboration avec Laurence Lamant (PU-PH IUCT), Nathalie Van Acker et François-Xavier Frenois (plateforme Imag'IN IUCT) nous avons démarré l'analyse par immunohistochimie de l'expression de marqueurs lysosomaux d'une cohorte de 51 patients atteints de mélanomes métastatiques traités par le nivolumab ou le pembrolizumab (Ac anti-

PD-1). Les lésions métastatiques ont été prélevées avant ou après le traitement. Nathalie Van Acker a mis au point une technique d'immuno-marquage utilisant quatre chromogènes différents. L'objectif de ces travaux est de comparer la « masse lysosomale » avec la réponse aux thérapies anti-PD-1 en parallèle de l'infiltrat de LT CD8<sup>+</sup>. Pour cela, nous avons choisi d'analyser les molécules suivantes : CD107a, CD8 et Sox-10 (cette dernière est un facteur de transcription exprimé par les cellules de mélanome). L'objectif est de comparer la réponse des patients aux immunothérapies avec le contenu des cellules de mélanome en lysosomes. Nous avons émis l'hypothèse suivante : les patients non répondeurs aux immunothérapies seraient potentiellement plus chargés en lysosomes, soit en outils moléculaires capables de contrer l'attaque des CTL. La question subsidiaire est la suivante : Le contenu en lysosomes peut-il être un marqueur prédictif de la réponse aux immunothérapies visant à potentialiser l'activité des CTL ?

Les premiers marquages obtenus à partir de 4 patients sont présentés **Figure III.7**. Ces résultats préliminaires sont relativement intéressants car on distingue différents profils d'expression de CD107a et d'infiltrats de LT CD8<sup>+</sup>. Un infiltrat de LT CD8<sup>+</sup> est observé dans 2 patients (**Figure III.7 a et b**) alors que très peu de LT CD8<sup>+</sup> sont observés dans les 2 autres patients. Parmi les 2 profils d'infiltrats de LT CD8<sup>+</sup>, on remarque une hétérogénéité d'expression CD107a avec un marquage plus important en **Figure III.7a** comparé aux cellules du patient en **Figure III.7b** qui semble presque dépourvu de CD107a. Parmi les 2 patients avec un faible infiltrat de LT CD8<sup>+</sup> (**Figure III.7 c et d**) on retrouve également une hétérogénéité du marquage de CD107a. Notamment les cellules de mélanome du patient illustré en **Figure III.7d** sont extrêmement chargées en lysosomes.

Ces données sont préliminaires mais permettent déjà d'observer une grande hétérogénéité du contenu en lysosomes des cellules de mélanome chez les patients. Au vu de l'hétérogénéité d'infiltration des LT CD8<sup>+</sup> et de réponses aux immunothérapies nous souhaitons vivement étudier une éventuelle corrélation entre les réponses cliniques, la présence de LT CD8<sup>+</sup> et la masse lysosomale.





**Figure III.7 : Marquage du contenu en lysosomes et de l'infiltrat de LT CD8<sup>+</sup> de lésions de mélanomes métastatiques humains.** Après une étape de déparaffinage, une étape de blocage de la peroxidase endogène suivi du marquage des Ac primaires, une seconde étape de blocage est réalisée avant le marquage avec des Ac secondaires couplé à différents chromogènes. Les marquages sont les suivants : CD107a (noir), SOX-10 (jaune), CD8 (violet), noyaux (bleu).

### III. B) La résistance des cellules de mélanome est-elle partagée par d'autres types de tumeur ?

#### 1. Les cellules de carcinome mammaire résistent à l'attaque des CTL

Pour répondre à cette question, nous nous sommes intéressés à un type de cancer particulier : le cancer du sein caractérisé par une importante activité protéase à l'origine du développement des métastases. En effet, ces cellules tumorales sont capables de sécréter des protéases dans le milieu extracellulaire pour dégrader la matrice extracellulaire. Cette propriété a conduit à l'étude des protéases comme de potentiels candidats moléculaires à valeur pronostic (Walsh and Roy, 2014). De plus, plusieurs essais cliniques de phase I de traitement anti-PD-1 ont révélé des réponses prometteuses pour le traitement de cancers du sein du sous-type triple négatif (Pusztai et al., 2016). Le sous type de cellules tumorales triples négatives est le plus agressif. Il est défini par les déficiences du récepteur aux oestrogènes, du récepteur à la progestérone et du facteur de croissance HER2. Cette propriété empêche l'utilisation de traitements de type hormonaux et d'Ac bloquant le récepteur à HER2.

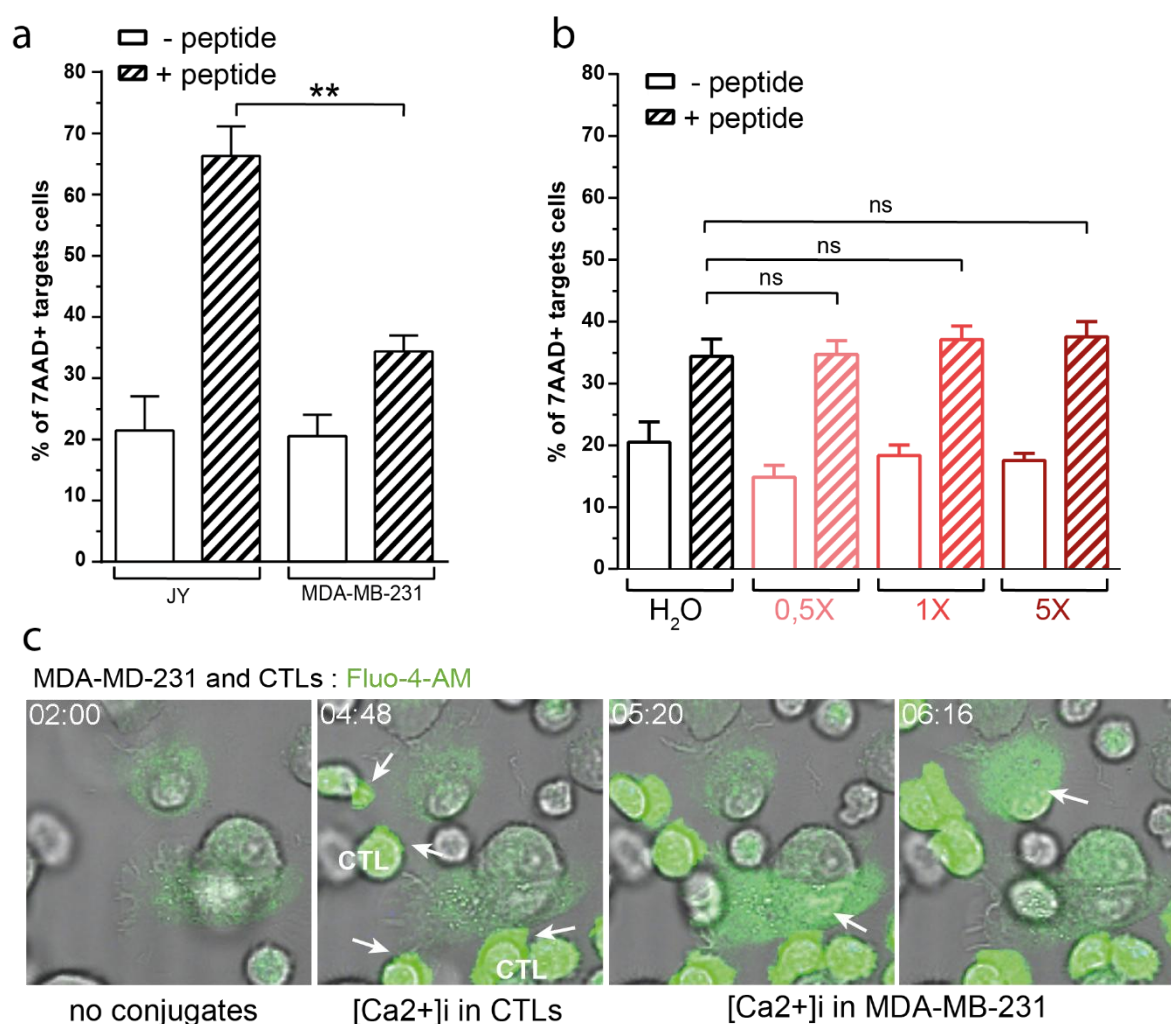
Pour cela, nous avons utilisé une lignée d'adénocarcinome mammaire HLA-A2<sup>+</sup> triple négative.

Nous avons pu montrer que les cellules MDA-MB-231 résistent à l'attaque des CTL (**Figure III.8a**). Cependant, le prétraitement par le cocktail d'inhibiteur préalablement utilisé pour augmenter la sensibilité des cellules de mélanome à l'attaque des CTL n'a pas d'effet sur la sensibilité des MDA-MB-231. Ces données suggèrent que ces cellules d'adénocarcinome mammaire ne semblent pas utiliser les protéases similaires aux cellules de mélanome pour résister à cette attaque (**Figure III.8b**). La question subsidiaire à ces résultats a été de déterminer s'il n'y a pas de défaut d'activation des CTL et de perforation des MDA-MB-231. Pour cela nous avons tout d'abord utilisé une approche de vidéomicroscopie (**Figure III.8c**). Les cellules tumorales et les CTL ont été marquées avec une sonde permettant de détecter la concentration de  $[Ca^{2+}]_i$ . Les résultats indiquent que dès les premières minutes de contact, une forte augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CTL est détectée, suivie par une augmentation dans les cellules cibles. Les CTL semblent donc capables de s'activer et de perforer la cellule cible. Ces données ont été confirmées par cytométrie en flux par la détection d'une



augmentation du turnover membranaire des MDA-MB-231 suite à l'attaque des CTL (résultats non présentés ici).

Ces données suggèrent la mise en place de mécanisme de résistance des cellules d'adénocarcinome mammaire à l'attaque des CTL activés et capables de perforer leur cellules cibles. Ces données préliminaires très intéressantes sont à approfondir pour définir le rôle du compartiment lysosomal dans cette résistance.

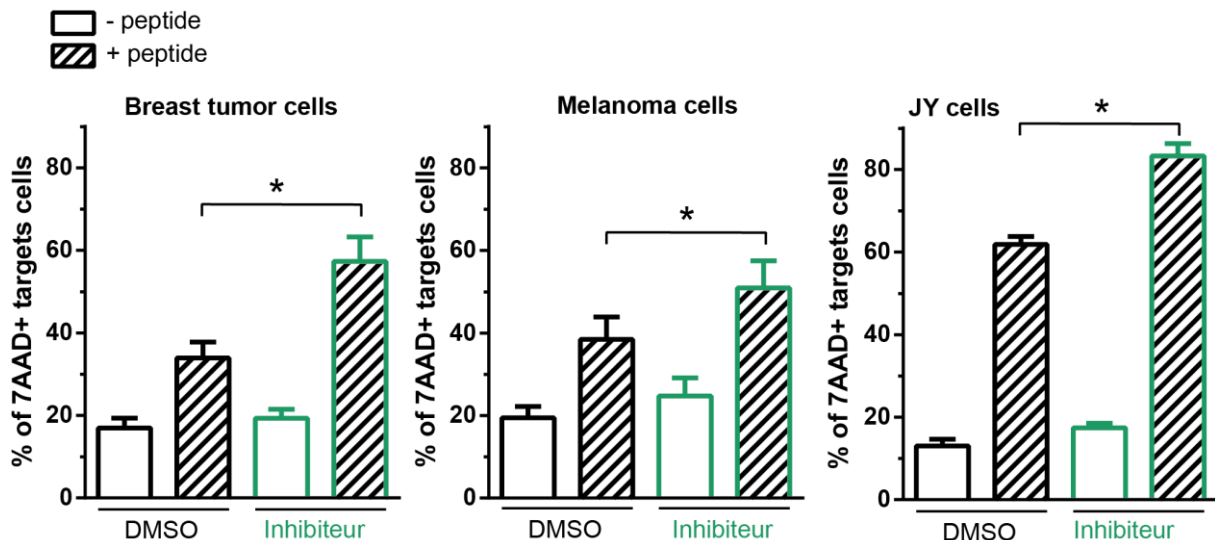


**Figure III.8 : Les cellules de carcinome mammaire résistent à l'attaque des CTL. (a)** Les cellules MDA-MB-231 (adénocarcinome mammaire) ou les cellules JY (sensibles à l'attaque des CTL) ont été pré-chargées avec le peptide antigénique puis lavées et conjuguées avec des CTL préalablement marqués au CFMFA. Le pourcentage de cellules 7-AAD<sup>+</sup> est représenté (n=6). **(b)** Les MDA-MB-231 ont été pré-traitées par différentes concentrations du cocktail d'inhibiteurs de protéases durant 2h d'incubation avec le peptide antigénique puis lavées avant l'ajout des CTLpréalablement marqués au CFMFA. Le pourcentage de cellules 7-AAD<sup>+</sup> est représenté (n=4). **(c)** Les MDA-MB-231 et CTL ont été marqués avec Fluo-4-AM durant 30min et la formation de conjugués a été observé par vidéomicroscopie au microscope confocale Zeiss 780 dans une chambre maintenue à 37°C et 5%CO<sub>2</sub>. Les différences statistiques ont été calculées avec le logiciel GraphPad Prism par un test de Mann-Whitney **(a)** et Wilcoxon **(b)**. \**p*<0,05

## 2. L'inhibition des protéases aspartiques

Nous nous sommes intéressés à un inhibiteur de protéases aspartiques déjà utilisé dans le traitement chez l'Homme d'un autre type de pathologie.

De façon surprenante nous avons pu montrer que l'ajout de cet inhibiteur durant 4h de conjugués CTL-cellules cibles augmentent la sensibilité des cellules d'adénocarcinome mammaire mais aussi des cellules de mélanome et potentialise également l'activité des CTL face à des cellules sensibles (**Figure III.9**).



**Figure III.9 : Un inhibiteur de protéase aspartique augmente la sensibilité des cellules cibles à l'attaque des CTL.** Les cellules MDA-MB-231 (adénocarcinome mammaire) ou les cellules D10 (mélanome) ou les cellules JY (sensibles à l'attaque des CTL) ont été pré-chargées avec le peptide antigénique puis lavées et conjuguées avec des CTL préalablement marqués au CMFDA en présence de 15μM d'inhibiteur des protéases aspartique. Le pourcentage de cellules 7-AAD<sup>+</sup> est représenté. Les résultats de 6 expériences indépendantes sont présentés et les différences statistiques ont été calculées avec le logiciel GraphPad Prism par un test Wilcoxon. \* $p < 0,05$

Ces données sont particulièrement intéressantes car l'augmentation de la mortalité des cellules cibles observée est spécifiquement due à l'attaque des CTL suggérant une augmentation de la sensibilité à la cytotoxicité induite par la voie perforine-granzymes. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que l'inhibition des protéases de la famille des protéases aspartiques altère les mécanismes de réponse à l'attaque des CTL partagés par plusieurs types cellulaires. Des travaux supplémentaires restent à réaliser dans le but de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués.

### **III. C) Application de la méthode brevetée à l'analyse de l'activation des CTL et de leur potentiel lytique face à des cellules sensibles**

Un des objectifs majeurs de ma thèse fut de mettre au point une technique pour analyser la réponse membranaire des cellules de mélanome à la fois rapide et quantitative à l'échelle de la population cellulaire. Les données obtenues face aux cellules de mélanome ont été détaillées en partie 1 des résultats dans la publication en cours de finalisation et montrent que cette méthode permet d'analyser simultanément l'activité des CTL et leur capacité à perforer la cellule cible. Des données complémentaires à ce test ont été faites et soulignent son intérêt dans d'éventuelles applications visant à analyser le potentiel des CTL (activation et perforation). C'est dans cet objectif que ce test a été breveté : METHODS AND KIT FOR ASSAYING LYTIC POTENTIAL OF IMMUNEFFECTOR CELLS (Numéro d'application du brevet : EP18306576.2).

Brièvement, nous avons montré que l'ajout d'un intercalant membranaire lipophile (portant un radical styryl) fluorescent durant la formation des conjugués cellules cibles-CTL permet d'analyser l'activité membranaire des CTL et des cellules cibles simultanément. Nous avons ici cherché à étudier le potentiel de cette méthode dans l'analyse de l'activité effectrice des CTL dépendante de la perforine face à des cellules sensibles à l'attaque des CTL.

Dans le but d'étudier la sensibilité de ce test nous avons analysé le turnover membranaire de CTL conjugués avec des cellules sensibles à l'attaque des CTL (les cellules JY) préalablement mis en présence de différentes concentrations de peptide antigénique. Tout d'abord nous avons comparé l'intensité de fluorescence du FM1-43 des CTL avec l'exposition de CD107a par les CTL. Nous pouvons observer une augmentation du pourcentage de CTL activés dépendant de la concentration antigénique (**Figure III.10**). De plus, de façon similaire aux résultats obtenus face aux cellules de mélanome (partie 1 figure supplémentaire 2), le pourcentage de cellules activées détecté par l'intégration de FM1-43 est plus important dans les premières minutes de contact par rapport au pourcentage de cellules activées détecté par l'exposition de CD107a (**Figure III.10b**). Ces données soulignent la sensibilité et la rapidité de ce test à la détection de l'activation des CTL.

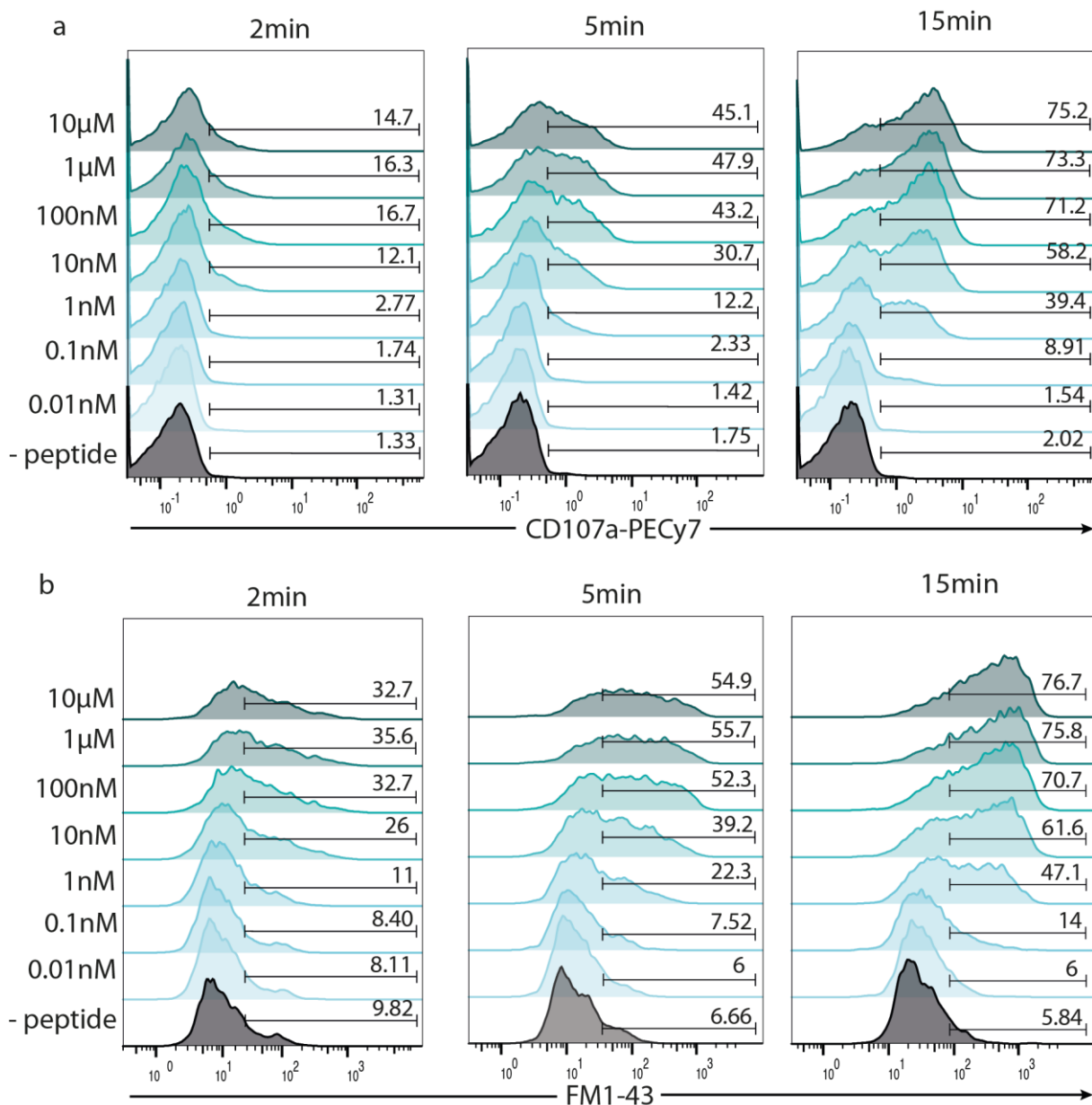
La **Figure III.11a** présente la cinétique d'internalisation du FM1-43 dans les cellules JY pré-incubées avec différentes concentrations de peptides antigénique, en parallèle du

pourcentage de CTL activés dans ces mêmes conditions en **Figure III.11b**. L'utilisation de cellules sensibles permet d'étudier une corrélation entre les résultats obtenus de l'internalisation du FM1-43 dans les cellules JY et dans les CTL dans les premières minutes de contact (**Figure III.11a et b**), avec la capacité à tuer des CTL sur une plus longue durée (**Figure III.11c**). Pour cela, les JY préalablement chargées avec le peptide antigénique ont été conjuguées 4h avec les CTL spécifiques de ce peptide. Le pourcentage de cellules mortes a été analysé par la fluorescence du 7-AAD (**Figure III.11c**). Les concentrations de peptides antigéniques qui ont activé un faible pourcentage de CTL et qui ont déclenché une faible réponse membranaire des cellules JY corrèlent avec un faible niveau de cytotoxicité induite par les CTL. De plus, on remarque que l'on atteint un certain seuil d'activation optimale des CTL, de réponse des cellules JY et de cytotoxicité induite par les CTL à partir de 100nM de peptide antigénique (les concentrations de peptides antigéniques supérieures ne modifiant pas ces paramètres). Cependant, deux concentrations de peptide antigénique sont particulièrement intéressantes. La première, de 0.01nM de peptide, ne permet pas de détecter d'activation des CTL et de réponse membranaire des cellules JY dans les 15 premières minutes de contact et ceci corrèlent avec une faible capacité lytique. Cette concentration permet d'émettre l'hypothèse que ce test est suffisamment sensible pour révéler un défaut d'activation des CTL qui corrèlent avec un défaut de leur activité lytique.

La seconde concentration intéressante est de 10nM de peptide antigénique. En effet, on observe que cette concentration ne permet pas une activation optimale des CTL dans les 15 premières minutes de contact comparé à des concentrations de peptide supérieures (**Figure III.11b**). De plus, cette concentration permet un killing maximal des cellules JY (**Figure III.11c**). Ce défaut d'activation dans les premières minutes ne corrèlent donc pas avec un défaut de cytotoxicité. Cependant, ce qu'il est intéressant de noter est l'observation à cette même concentration que les cellules JY ont atteint leur seuil de réponse membranaire maximal (**Figure III.11a**). Ceci indique que ce niveau de réponse membranaire corrèlent avec le niveau de perforation suffisant pour induire une cytotoxicité maximale de ces cellules JY. Autrement dit, le niveau d'activation des CTL observé en **Figure III.11b** à 10nM est suffisant pour induire une cytotoxicité maximale de ce type cellulaire et ceci corrèlent avec un niveau de perforation de la cellule cible maximal.

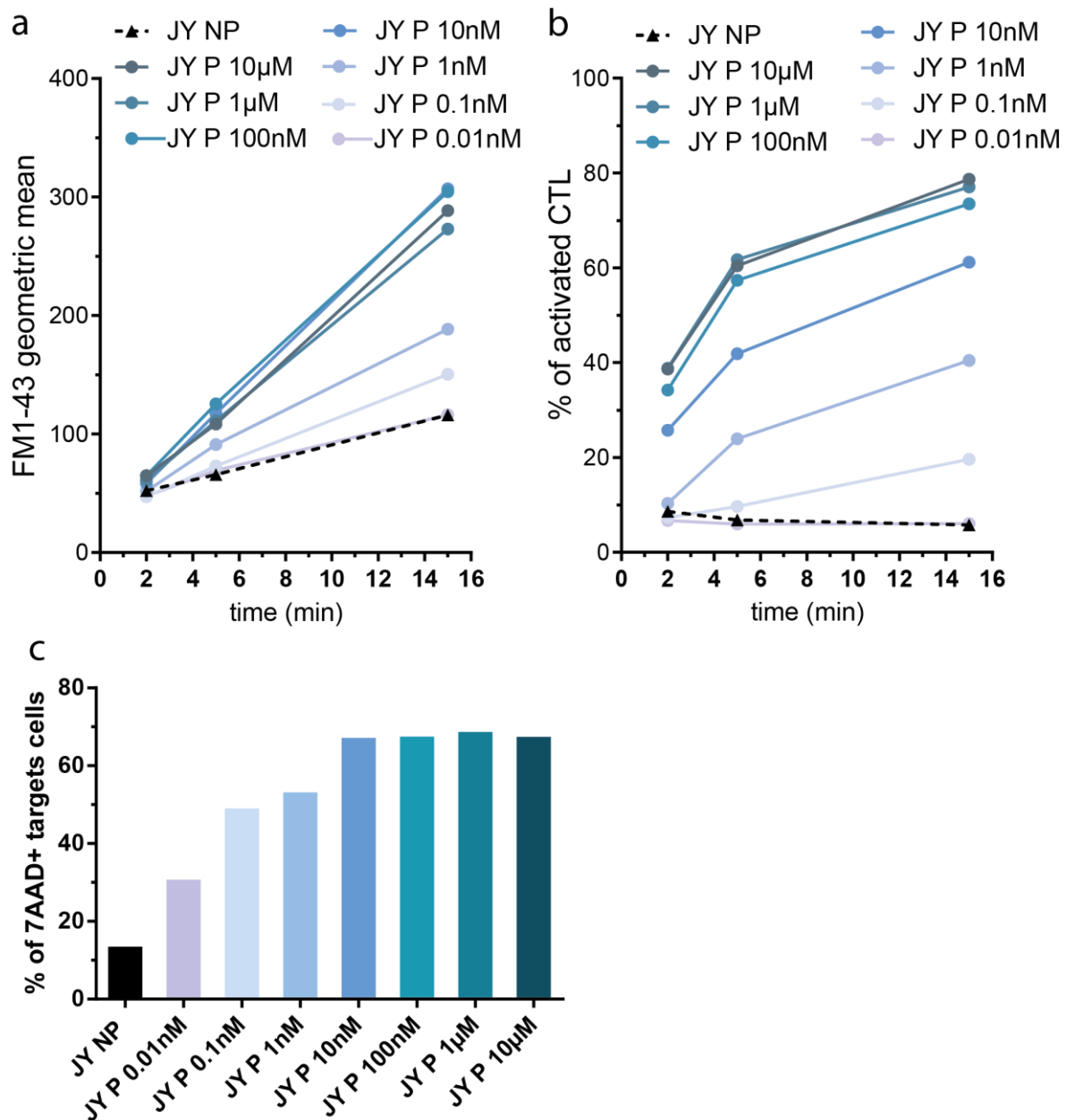
Ces données suggèrent plusieurs avantages à l'utilisation de ce test pour l'analyse de l'activité effectrice perforine-dépendante des CTL. Tout d'abord, il est sensible à la

stimulation antigénique. De plus, il permet, dans un modèle de cellules sensibles à l'attaque des CTL, d'étudier le niveau d'activation et la capacité à perforer les cellules cibles en parallèle. Ce test permet donc, face à un type cellulaire donné non résistantes à l'attaque des CTL, d'étudier le potentiel lytique des CTL. Cette méthode s'avère ainsi particulièrement intéressante à tester dans des expériences qui visent à potentialiser ou au contraire altérer l'activité lytique des CTL perforine-dépendante.



**Figure III.10 : Comparaison de l'exposition de CD107a à l'intégration de FM1-43 dans les CTL.** Les cellules JY ont été mis en présence de différentes concentrations de peptide antigénique et conjugués avec les CTL spécifiques de ce peptide durant 2, 5 et 15min. **(a)** Après ces différents temps de contact, l'exposition de CD107a à la membrane plasmique a été marqué et analysé par cytométrie en flux. Les nombres indiqués sont les pourcentages de CTL CD107a<sup>+</sup>. **(b)** Durant la formation des conjugués CTL-cellules JY, 10µg/ml de FM1-43

ont été ajouté dans le milieu de culture et la fluorescence de FM1-43 des CTL est représentée. Les nombres indiqués sont les pourcentages de CTL dans lesquels l'intensité de fluorescence de FM1-43 a augmenté par rapport aux CTL face à des cellules JY en absence de peptide antigénique.



**Figure III.11 : L'activation des CTL détectée par l'internalisation de FM1-43 corrèle avec leur activité lytique.** Les cellules JY ont été mis en présence de différentes concentrations de peptide antigénique et conjugués avec les CTL spécifiques de ce peptide durant 2, 5 et 15min. **(a)** Durant la formation des conjugués CTL-cellules JY, 10μg/ml de FM1-43 ont été ajouté dans le milieu de culture et la fluorescence de FM1-43 analysée dans les cellules JY est représentée. **(b)** Le pourcentage de CTL activés détecté par l'internalisation de FM1-43 après différents temps de contact avec les cellules JY est représenté. **(c)** Les cellules JY préincubées avec différentes concentrations de peptide antigénique sont conjugués avec les CTL durant 4h et le % de cellules JY 7-AAD<sup>+</sup> est représenté.

## IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La synapse lytique formée par les CTL et leurs cellules cibles constitue une aire de contact spécialisée permettant de concentrer les molécules lytiques localement. La spécificité, l'efficacité de cette interaction et son effet sur la mort de la cellule cible place ce mécanisme au cœur des thérapies anti-tumorales. En effet, l'altération de l'activité des CTL par les cellules tumorales a été décrite dans de nombreux types de cancers (Beatty and Gladney, 2015). Or, la mise en place des mécanismes effecteurs des CTL nécessite la formation d'une synapse lytique fonctionnelle. On distingue ainsi dans la littérature deux niveaux d'interférence avec la synapse lytique mise en place par les cellules tumorales pour altérer la fonction des CTL :

i) au niveau moléculaire via l'interférence directe sur les molécules de signalisation

Un des mécanismes majoritairement décrit est l'inhibition de la signalisation du TCR par l'expression par les cellules tumorales de ligands des récepteurs de co-signalisation inhibiteur tels que PD-L1 (Huang et al., 2018). Diverses stratégies thérapeutiques ont ainsi été développées pour cibler cette voie. Ces stratégies se sont avérées encourageantes mais déclenchent de nombreux effets secondaires (Bajwa et al., 2019), due à l'absence de spécificité du traitement, et de nombreux cas de rechutes sont observés (Jenkins et al., 2018; Klemen et al., 2019; Liao et al., 2019).

ii) au niveau de la structure de la synapse lytique

Des études dans le contexte tumoral émergent dans la littérature non pas sur des défauts d'activation signalétique du TCR mais sur les étapes de la formation de la synapse lytique, sa dynamique et sa fonction de sécrétion polarisée (Díaz et al., 2018; Ramsay et al., 2008).

Disséquer en détails les événements moléculaires et la cinétique de ces événements mis en place à la synapse lytique s'avère donc essentiel à la compréhension du défaut d'activité cytotoxique des CTL dans un contexte tumoral. Notre équipe a contribué à la recherche dans ce domaine par une nouvelle approche de l'étude de la SI. L'une des hypothèses de travail est de comprendre si lors de l'attaque des CTL, des événements moléculaires sont mis en place par la cellule cible qui pourraient interférer avec l'attaque dépendante de la perforine à la SI. Pour cela, nous utilisons un modèle cellulaire de CTL spécifique d'un antigène donné. La force de ce modèle est la possibilité de mettre en présence les CTL avec des cellules cibles préchargées ou non avec le peptide antigénique reconnu par les CTL. Ainsi il est possible

d'émettre des conclusions sur les effets observés spécifiquement due à la reconnaissance de l'antigène et donc à l'activation des CTL. De plus, nous avons pu mettre en évidence que ce modèle permet d'induire une forte activation des CTL face à plusieurs types cellulaires telles que les cellules cibles conventionnelles (JY) ainsi que des cellules tumorales telles que les cellules de mélanome (Bertrand et al., 2013; Khazen et al., 2016; partie 1 résultats fig supplémentaire 2). Dans ce contexte, l'équipe a émis l'hypothèse que le défaut d'activité cytotoxique des CTL observé dans de nombreux contextes tumoraux pourrait être la résultante d'un défaut de l'activité lytique synaptique. L'étude de cette hypothèse a conduit l'équipe vers la découverte d'un nouveau mécanisme de résistance des cellules de mélanome basé sur l'exposition du compartiment LLE (Lysosomes Late Endosomes) suite à l'attaque des CTL (Khazen et al., 2016). Les cellules de mélanome répondent par une exposition de leur compartiment lysosomal à la surface de la cellule et conduit à la dégradation de la perforine.

Ce projet révèle un nouveau défaut de la fonction finale de la synapse lytique, l'induction de la lyse des cellules cibles, indépendant de l'activation des CTL. Ces résultats ont ouvert de multitudes questions allant des mécanismes moléculaires impliqués dans le déclenchement de la réponse à l'étude de leur cinétique et de leur implication dans différents contextes.

Durant ma thèse nous nous sommes intéressés aux évènements moléculaires qui déclenchent cette réponse dès les premières minutes de contact avec les CTL. Nous avons pu montrer que l'exposition lysosomale est partie intégrante d'une activité de recyclage membranaire déclenchée par la formation de pores par la perforine. Ces derniers entraînent une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  qui démarre à la synapse lytique. Ce signal démarre localisé au site de contact avec les CTL et déclenche des évènements de sécrétion lysosomale également localisés à la synapse lytique. De plus, nous avons pu montrer que les cellules de mélanome sont capables de répondre à l'attaque des CTL très rapidement, avant même la polarisation complète de la machinerie lytique des CTL. Enfin, nous avons pu démontrer un rôle protecteur de la signalisation calcique dépendante de la SytVII dans les cellules de mélanome. Altérer le signal calcique augmente significativement la sensibilité des cellules de mélanome à l'attaque des CTL.

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence un nouveau rôle de la signalisation calcique à la synapse lytique, impliquée alors dans le CTL autant que dans la cellule cible. En effet, dans les CTL, le  $\text{Ca}^{2+}$  est un messenger moléculaire majeur dans l'induction des fonctions



effectrices. Cette étude révèle comment les cellules de mélanome peuvent également utiliser la signalisation calcique à leur profit. L'ensemble de ces données place le  $\text{Ca}^{2+}$  comme un acteur moléculaire déterminant de la fonction de la synapse lytique via son rôle de médiateurs de la sécrétion vésiculaire partagé par les CTL et les cellules de mélanome.

### **L'attaque localisée des cellules de mélanome par les CTL**

Nous avons pu démontrer une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  localisée à la synapse lytique par la formation de gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  et retarder ce signal de quelques minutes par un traitement au BAPTA-AM entraîne une augmentation de la sensibilité des cellules de mélanome. Ces données suggèrent l'importance de la localisation, la cinétique et l'intensité du signal calcique dans la mise en place des réponses par les cellules de mélanome. En effet, de nombreuses études dans la littérature soulignent l'importance de la régulation du signal calcique pour déterminer sa fonction. Parmi ces données, il est établi que dans les CTL la durée et la fréquence du signal calcique sont directement impliqués dans la mise en place des réponses effectrices des CTL (Dushek et al., 2008; Hogan, 2017; Lyubchenko et al., 2001; Pfeifhofer-Obermair et al., 2012). L'importance de la régulation du signal calcique a également été montré dans les mécanismes de réparation membranaire. En effet, modifier la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire altère les mécanismes de réparation membranaire causés par un dommage membranaire. A l'inverse, altérer les mécanismes de réparation membranaire entraîne des augmentations non contrôlées de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) qui déclenchent la mort des cellules (Cai et al., 2009; Cheng et al., 2015; McNeil, 2009; Prins and Michalak, 2011). Il serait ainsi intéressant d'étudier plus en détail les gradients de  $\text{Ca}^{2+}$  observés dans nos travaux : i) leur localisation d'abord synaptique puis diffuse dans la cellule et ii) l'intensité du signal reflétée par la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  la dynamique des oscillations de  $\text{Ca}^{2+}$

i) Pour étudier le rôle de la localisation du signal nous avons effectué des études préliminaires avec la perforine soluble qui déclenche une perforation à plusieurs endroits de la cellule. Ces données préliminaires indiquent qu'une faible concentration de perforine ne déclenche pas de mécanisme de recyclage membranaire et une trop forte concentration déclenche la mort des cellules. Ces données restent à approfondir mais soulignent l'importance de la localisation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces résultats suggèrent que de multiples perforation de la membrane plasmique à différentes localisations de la cellule ne sont pas

régulées par les cellules de mélanome qui n'est plus capable de réguler des entrées multiples de  $\text{Ca}^{2+}$  et entre alors en apoptose. Cependant, ces données résultent de l'analyse du recyclage membranaire par cytométrie en flux et n'excluent pas la mise en place d'une exposition lysosomale localisée et rapide suite à l'ajout des molécules de perforine. Ces résultats sont à compléter par l'étude de l'exposition de CD107a-mApple-pHluorin par vidéomicroscopie. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que de faible concentration de perforine entraîne une perforation localisée qui ne déclenche pas des événements de recyclage membranaire majeur quantifiable par cytométrie en flux mais seulement quelques événements de sécrétion lysosomale suffisant pour réparer les pores formés. Une autre approche qui pourrait permettre d'étudier la conséquence de plusieurs perforations non localisées dans une seule zone serait l'augmentation du nombre de CTL.

ii) L'étude de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  qui entre par les pores de perforine s'avère plus complexe. En effet, cette problématique soulève une contrainte majeure : les CTL sont dépendants de  $\text{Ca}^{2+}$  pour nombres de leurs mécanismes effecteurs dont la polymérisation de la perforine. Cette propriété nous contraint d'éviter des modifications de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire qui nous permettrait d'en étudier les effets sur les mécanismes de résistance des cellules de mélanome. Un outil moléculaire pourrait permettre de modifier les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu de culture tout en vérifiant la fonctionnalité de la perforine serait l'utilisation d'une perforine fluorescente fonctionnellement active.

Cependant, en plus de l'entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  que nous pouvons observer, il serait intéressant d'analyser l'activation du relargage des stocks intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la réponse des cellules de mélanome. Au vu de la charge lysosomale de ces cellules et de l'implication directe des lysosomes dans la résistance des cellules de mélanome nous pouvons émettre l'hypothèse d'un rôle de ces organites également dans la transmission du signal d'attaque déclenchée par l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par la perforine. En effet, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  des lysosomes est régulée par des canaux tels que TRPML (Davis et al., 2012; Morgan and Galione, 2014) qui pourrait être impliqué dans la régulation plus tardive du signal calcique que l'on observe. Cependant il est important de noter que le signal calcique déclenché par une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu extracellulaire vers le cytosol de la cellule cible est plus important que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  transportés par les organites intracellulaires. En effet, la concentration du milieu extracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  est  $\sim 2\text{mM}$  (Andrews et al., 2014; McNeil and

Kirchhausen, 2005) alors que les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  lysosomaux sont  $\sim 0,5\text{Mm}$  (Lloyd-Evans et al., 2008).

Enfin, un dernier paramètre pourrait être impliqué dans la régulation de la réponse des cellules de mélanome à l'attaque des CTL est la taille du pore formé par la perforine. Il serait intéressant d'étudier la réponse des cellules de mélanome à d'autres protéines capables de former des pores. La streptolysin O par exemple qui forme des pores de 25 à 30nm comparé à ceux formés par la perforine de 16nm.

### **Le recyclage membranaire des cellules de mélanome dans la dégradation des molécules lytiques**

L'ensemble des résultats obtenus durant de ma thèse (ajouté à ceux de l'équipe (Khazen et al., 2016)) ont permis de mettre en évidence : une activation du recyclage membranaire des cellules de mélanome suite à l'attaque des CTL, le rôle de l'activité protéase et de l'acidité du pH vésiculaire dans la résistance des cellules de mélanome. Deux modèles pourraient alors expliquer la localisation subcellulaire de la dégradation de la perforine.

En effet, le trafic vésiculaire est un réseau complexe qui fait intervenir une activité de recyclage membranaire donc d'endocytose et d'exocytose. Nous pouvons donc envisager 2 hypothèses de la localisation de la dégradation de la perforine : à l'extérieur de la cellule dans l'aire synaptique ou dans des compartiments d'endocytose de la cellule de mélanome. Concernant la 1<sup>ère</sup> hypothèse, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  que nous avons observé par vidéomicroscopie ultrarapide montre que la perforine se lie à la membrane plasmique des cellules de mélanome. De plus, l'exposition des lysosomes détectée dès les premières minutes de contact suggère un relargage du contenu lysosomal dans le milieu extracellulaire très rapide et pas une implication de ce contenu lysosomal interne. Ces données laissent supposer que le contenu lysosomal de protéases est sécrété et dégrade la perforine à la synapse lytique.

Cependant, certaines de nos données peuvent également corrélérer avec la seconde hypothèse d'endocytose de la perforine pour permettre sa dégradation. En effet, les protéases lysosomales sont actives à pH acide, une dégradation de la perforine à la synapse lytique serait donc possible par la création d'un microenvironnement synaptique acide. Or nous avons pu montrer l'exposition de CD107a par l'utilisation de la pHluorin, un senseur dépendant du pH. La pHluorin devient fluorescente à pH neutre donc un microenvironnement synaptique acide ne devrait pas permettre de la visualiser. De plus,

l'acidité du compartiment lysosomal étant maintenue par la V-ATPase nous avons étudié la localisation subcellulaire de la V-ATPase après attaque des CTL. Nous n'avons pas observé de relocalisation synaptique de la V-ATPase qui pourrait permettre de maintenir un microenvironnement synaptique acide. D'autre part, nous avons observé un enrichissement important dans les cellules de mélanome de la protéine EEA1, un marqueur des endosomes précoces (au niveau basal, sans contact avec les CTL). Enfin, l'un de nos principaux résultats en faveur de l'activation de la voie d'endocytose est l'importante internalisation du FM1-43 traduit par un recyclage membranaire actif. Ces données ne nous permettent donc pas d'exclure l'hypothèse de l'internalisation de la perforine dans les compartiments vésiculaires acides de la cellule de mélanome conduisant à sa dégradation.

Une hypothèse permet cependant d'intégrer ces 2 modèles : la formation de pores à la membrane plasmique déclenche une sécrétion lysosomale synaptique compensée par des mécanismes d'endocytose rapide entraînant une internalisation des molécules lytiques dans des endosomes précoces qui au vu de la charge lysosomale des cellules de mélanome fusionnent rapidement avec les lysosomes permettant de désactiver la perforine par l'acidité du pH et l'activité des protéases lysosomales.

### **La cinétique de réponse des cellules de mélanome**

Les travaux de l'équipe ont montré que les CTL sont capables de sécréter leurs granules lytiques très rapidement après l'engagement du TCR et ceci indépendamment de la polarisation du MTOC (Bertrand et al., 2013). Cette propriété se traduit par la capacité des CTL à tuer de multiples cellules cibles dans une fenêtre de temps extrêmement courte et renforce leur efficacité. Cependant, nous avons pu mettre en évidence que les cellules de mélanome sont capables de percevoir cette attaque et d'y répondre par une exposition de leur compartiment lysosomal très rapide. Nous avons pu observer en effet une exposition lysosomale des cellules de mélanome localisée à la synapse lytique qui précède la repolarisation du MTOC des CTL. Ces données suggèrent la mise en place d'une barrière protectrice synaptique très rapide dans les cellules de mélanome. L'étude de la cinétique de ces événements moléculaires nous permet ainsi d'émettre l'hypothèse que lors de la polarisation du large pool de granules lytiques les cellules de mélanome ont déjà démarré des mécanismes de réparation membranaire protecteurs et altère ainsi l'efficacité des

molécules lytiques. L'efficacité et la rapidité d'attaque des CTL seraient dans ce modèle un avantage pour la cellule de mélanome.

### **L'activité de recyclage membranaire, un facteur prédictif de la résistance de cellules tumorales à l'attaque des CTL**

Nous avons pu mettre en évidence que l'attaque des CTL déclenche une activité de recyclage membranaire dans les cellules cibles et les CTL. Cependant il est difficile de corréler l'intensité de cette activité, analysée par l'intensité de fluorescence, avec la capacité des cellules à résister à l'attaque des CTL. En effet, cela impliquerait un certain seuil de fluorescence au-delà duquel les cellules sont capables de résister à l'attaque des CTL. Les données obtenues avec les différentes lignées de cellules de mélanome semblent indiquer que le paramètre qui pourrait être important est la réactivité des cellules à répondre dans les premières minutes de contact. En effet, des données préliminaires indiquent qu'une forte capacité à augmenter le turnover membranaire dans les premières minutes de contact corréle avec la capacité à résister des différentes lignées testées. On remarque en effet que cette réactivité est plus tardive dans les cellules sensibles. Ces données préliminaires suggèrent que la rapidité à répondre plus que la capacité à répondre est un facteur important de résistance des cellules de mélanome à l'attaque des CTL. Cette hypothèse corréle avec la sécrétion lysosomale des cellules de mélanome rapide déclenchée avant même la polarisation complète de la machinerie lytique des CTL démontrée dans la partie 1 des résultats.

L'activité de recyclage membranaire serait donc intéressante à étudier au sein des cellules de mélanome provenant de différents patients. En effet, il est connu que les cellules de mélanomes interpatients sont hétérogènes et répondent différemment aux immunothérapies. Il serait donc intéressant d'étudier s'il existe une hétérogénéité de l'activité membranaire des cellules de mélanome primaires en corrélation avec leur capacité à résister aux CTL par l'utilisation du compartiment lysosomale. En plus de l'hétérogénéité inter patients il serait intéressant d'étudier l'hétérogénéité au sein d'une même population cellulaire.

Cependant, il est important de souligner que l'ensemble de nos résultats suggèrent qu'un seul paramètre ne suffit pas à expliquer la résistance synaptique des cellules de mélanome à

l'attaque des CTL. Nous avons pu montrer notamment que le contenu vésiculaire en protéases est également un facteur essentiel.

### **Comment cibler spécifiquement le compartiment lysosomal des cellules de mélanome ?**

Pour répondre à cette problématique nous avons démarré une approche de caractérisation du contenu protéolytique des cellules de mélanome comparé à des cellules sensibles et des CTL. Nous avons pu confirmer que les CTL nécessitent des protéases pour leur fonction effectrice. Les granzymes sont des protéases et la maturation de la perforine a été montré comme protéases dépendante. L'étude des protéases dans ce contexte est ainsi particulièrement complexe. Une approche de spectrométrie de masse nous permettrait de déterminer les protéases présentes et leur quantité afin d'étudier l'existence de potentielles cibles exprimées uniquement dans les cellules de mélanome ou dont l'expression est mutée dans ces cellules. Ces données devront être suivies de tests *in vitro* visant à caractériser ces protéases pour leur capacité à cliver la perforine. Des inhibiteurs de protéases seuls ou en combinaison pourront ensuite être testés dans le but d'altérer la défense des cellules de mélanomes sans impacter le potentiel lytique des CTL.

Les résultats obtenus suite à l'inhibition de la famille des protéases aspartiques nous encouragent vivement à étudier l'implication de cette famille de protéases dans la résistance aux CTL. L'augmentation spécifique de la sensibilité à la lyse de plusieurs types cellulaires suggère l'existence d'un mécanisme partagé par plusieurs types cellulaires pour répondre à l'attaque dépendante de la perforine. Ces données sont particulièrement intéressantes à replacer dans le contexte de la réparation membranaire. Ce mécanisme ancestral de protection cellulaire pourrait avoir également été mis en place par tout types cellulaires et augmenter par les cellules tumorales suite à l'attaque des CTL. Potentialiser l'activité des CTL par l'inhibition d'une famille de protéases via un inhibiteur déjà utilisé en thérapie pour une autre pathologie s'est avéré être un résultat très prometteur. Les expériences prioritaires à venir seront d'analyser si cet inhibiteur n'a pas d'effet sur l'activité des CTL.

### **La résistance des cellules de mélanome est intrinsèque au lignage mélanocytaire et partagé par d'autres types de tumeurs**

Nous avons pu mettre en évidence que la résistance des cellules de mélanome semble intrinsèque au lignage mélanocytaire par le test d'une lignée de mélanocytes humains que

nous avons pu adapter à notre modèle cellulaire. Ces données sont particulièrement intéressantes au vu de la fonction de ce lignage initiale de sécrétion de la mélanine. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse d'un mécanisme de recyclage membranaire et d'utilisation du compartiment vésiculaire initialement présent qui s'avère bénéfique à la cellule de mélanome après la transformation tumorale.

Ces résultats sont particulièrement intéressants à intégrer avec la littérature sur l'activation d'une réponse anti-tumorale contre les cellules de mélanome. En effet il a été montré (comme détaillé en introduction) que le vitiligo est un facteur de bon pronostic pour les patients atteints de mélanome métastatique. Il est ambitieux mais tentant d'émettre l'hypothèse que ces patients disposent de mélanocytes peu résistants à l'attaque des CTL ou de CTL particulièrement efficaces leur permettant d'éliminer la tumeur mais avec des conséquences sur les mélanocytes. Il serait donc intéressant de comparer nos résultats avec d'autres lignées de mélanocytes humains pour tester s'il existe une hétérogénéité de résistance des mélanocytes qui pourrait expliquer l'efficacité de l'utilisation des immunothérapies.

Enfin, nous avons pu montrer que la capacité à résister des cellules de mélanome peut également être partagée par d'autres types de tumeur telle que les cellules d'adénocarcinome mammaire triple négative. Ces données sont en cours de finalisation afin de déterminer si ce type de tumeur utilise également le compartiment vésiculaire acide et une activité de recyclage membranaire similaire aux cellules de mélanome. Ces données sont particulièrement intéressantes à développer car contrairement au mélanome, envisager les immunothérapies dans le traitement du cancer du sein est une stratégie récente (Pusztai et al., 2016). Il serait donc intéressant de proposer en plus du développement des immunothérapies des thérapies qui visent en parallèle à altérer la défense des cellules d'adénocarcinome mammaire. Nous avons particulièrement démarré ce projet grâce à une collaboration avec le service d'anatomopathologie de l'IUCT me permettant de récupérer des échantillons d'adénocarcinome mammaire. J'ai pu mettre au point une approche pour isoler les cellules tumorales des patients HLA-A2<sup>+</sup> afin de tester leur résistance face aux CTL spécifiques d'un antigène donné. Ces données seront poursuivies dans l'équipe dans le but d'évaluer si les cellules provenant de « tumeurs fraîches » ont cette propriété de résistance. Une démarche similaire est en cours avec des mélanomes

provenant de patients (mais l'obtention de « tumeurs fraîches » est ici beaucoup plus rare que le carcinome mammaire).

### **La résistance des cellules de mélanome dans le microenvironnement tumoral**

Nous avons démarré l'étude du compartiment lysosomal dans le microenvironnement tumoral par une approche d'immunohistochimie optimisée pour le marquage de 4 couleurs. Nous disposons d'une cohorte de 51 patients traités par le nivolumab ou pembrolizumab qui ont répondu ou non à la thérapie. Ces résultats sont préliminaires mais déjà intéressants car nous avons pu observer une hétérogénéité de l'expression du marqueur du compartiment lysosomal entre les patients. Cette hétérogénéité sera donc intéressante à corrélérer avec la variabilité de réponses aux thérapies. L'hypothèse sous jacente est que CD107a pourrait être un marqueur prédictif de la réponse aux immunothérapies. Un autre niveau d'hétérogénéité sera également étudié, une hétérogénéité intra-tumorale. En effet nous souhaitons déterminer s'il existe des variations de l'expression de CD107a corrélées avec la présence ou l'absence de LT CD8<sup>+</sup>.

Une approche complémentaire serait l'utilisation de modèles murins. En effet il est aujourd'hui clairement établi que le microenvironnement tumoral peut influencer l'expression des gènes des cellules tumorales et leur fonction. Le modèle que nous pourrions suggérer est un modèle de souris humanisées qui nous permettrait d'injecter les cellules de mélanome humaine en présence de CTL. Les souris humanisées sont des souris immunodéficientes auxquelles des cellules hématopoïétiques souches ou des PBMC sont ajoutés. Les deux caractéristiques de ces modèles sont de permettre une greffe de tissu humain dans un microenvironnement immunodéficient. Plusieurs études ont permis de mettre au point des modèles adaptés à ces problématiques notamment la souche NOD-scid. Ce modèle murin permet le développement de cellules souches hématopoïétiques et PBMC humains et la déficience pour des récepteurs aux cytokines entraîne un défaut majeur de développement des LT et LB murins et prévient également du développement des cellules NK. Il serait intéressant de déterminer dans ce contexte si altérer la défense lysosomale des cellules de mélanome (en transférant des cellules déficientes en molécules impliquées dans la résistance lysosomale) a un impact tout d'abord sur la croissance tumorale puis sur l'efficacité des CTL.



## V. CONCLUSION

Le développement des immunothérapies place l'activité cytotoxique des CTL par la formation de la SI au cœur des recherches visant à améliorer l'élimination tumorale. Cette étude contribue à élucider les mécanismes moléculaires mise en place par les cellules tumorales pour contrer l'attaque des CTL. La capacité des cellules de mélanome à déclencher des mécanismes de réparation membranaire très rapidement suite à l'attaque des CTL révèle un nouveau dialogue synaptique alors bénéfique pour la cellule tumorale. Ces résultats placent également le  $\text{Ca}^{2+}$  comme messager moléculaire essentiel au devenir fonctionnel de la synapse lytique de part son rôle partagé par les deux types cellulaires engagés. Il permet une activation efficace des CTL contrer par une exposition lysosomale des cellules de mélanome dans une fenêtre de temps de l'ordre de la minute. Nous pouvons ainsi proposer que dans un contexte tumoral, cibler les mécanismes de réparation membranaire simultanément à la potentialisation de l'activité des CTL par les immunothérapies actuellement utilisées pourrait permettre contrebalancer le dialogue synaptique en faveur des CTL.

L'ensemble de ces résultats nous conduit à suggérer un nouveau rôle de la synapse lytique formée par les cellules de mélanome et les CTL. Par sa fonction de concentration des molécules lytiques cette structure moléculaire est, dans ce modèle, bénéfique à la cellule de mélanome. Ce projet oriente vers une nouvelle approche qui serait de contourner la synapse lytique par l'utilisation de complexes moléculaires ciblés et composés des molécules lytiques permettant de générer de multiples attaques de la cellule tumorale.

## VI. BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Remaileh, M., Wyant, G.A., Kim, C., Laqtom, N.N., Abbasi, M., Chan, S.H., Freinkman, E., and Sabatini, D.M. (2017). Lysosomal metabolomics reveals V-ATPase-and mTOR-dependent regulation of amino acid efflux from lysosomes. *Science* 358, 807–813.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 834–846.
- Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relevance. 272, 7.
- Al-Batran, S.-E., Rafiyan, M.-R., Atmaca, A., Neumann, A., Karbach, J., Bender, A., Weidmann, E., Altmannsberger, H.-M., Knuth, A., and Jäger, E. (2005). Intratumoral T-cell infiltrates and MHC class I expression in patients with stage IV melanoma. *Cancer Res.* 65, 3937–3941.
- Alexandrov LB et al. Signatures of mutational processes in human cancer. (2013) *Nature* 500, 415-21
- Altan-Bonnet, G., and Germain, R.N. (2005). Modeling T Cell Antigen Discrimination Based on Feedback Control of Digital ERK Responses. *PLoS Biol.* 3, e356.
- Andrade, F., Fellows, E., Jenne, D.E., Rosen, A., and Young, C.S.H. (2007). Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. *EMBO J.* 26, 2148–2157.
- Andres, P.G., Howland, K.C., Dresnek, D., Edmondson, S., Abbas, A.K., and Krummel, M.F. (2004). CD28 Signals in the Immature Immunological Synapse. *J. Immunol.* 172, 5880–5886.
- Andrews, N.W., Almeida, P.E., and Corrotte, M. (2014). Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends Cell Biol.* 24, 734–742.
- Arden, B., Klotz, J.L., Siu, G., and Hood, L.E. (1985). Diversity and structure of genes of the  $\alpha$  family of mouse T-cell antigen receptor. *Nature* 316, 783.
- Attia, P., Maker, A.V., Haworth, L.R., Rogers-Freezer, L., and Rosenberg, S.A. (2005). Inability of a Fusion Protein of IL-2 and Diphtheria Toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to Eliminate Regulatory T Lymphocytes in Patients With Melanoma: *J. Immunother.* 28, 582–592.
- Aubert, O., Kamar, N., Vernerey, D., Viglietti, D., Martinez, F., Duong-Van-Huyen, J.-P., Eladari, D., Empana, J.-P., Rabant, M., Verine, J., et al. (2015). Long term outcomes of transplantation using kidneys from expanded criteria donors: prospective, population based cohort study. *BMJ* h3557.
- Azoury, S.C., and Lange, J.R. (2014). Epidemiology, Risk Factors, Prevention, and Early Detection of Melanoma. *Surg. Clin. North Am.* 94, 945–962.
- Babiychuk, EB, Monastyrskaya, K, Potez S and Draeger, A. Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death and Differentiation* (2011) 18, 80–89
- Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* 162, 435–442.

- Bahadoran, P., Aberdam, E., Mantoux, F., Buscà, R., Bille, K., Yalman, N., Saint-Basile, G. de, Casaroli-Marano, R., Ortonne, J.-P., and Ballotti, R. (2001). Rab27a: A Key to Melanosome Transport in Human Melanocytes. *J. Cell Biol.* *152*, 843–849.
- Baitsch, L., Baumgaertner, P., Devêvre, E., Raghav, S.K., Legat, A., Barba, L., Wieckowski, S., Bouzourene, H., Deplancke, B., Romero, P., et al. (2011). Exhaustion of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells in metastases from melanoma patients. *J. Clin. Invest.* *121*, 2350–2360.
- Bajwa, R., Cheema, A., Khan, T., Amirpour, A., Paul, A., Chaughtai, S., Patel, S., Patel, T., Bramson, J., Gupta, V., et al. (2019). Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors (Programmed Death-1 Inhibitors and Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Inhibitors): Results of a Retrospective Study. *J. Clin. Med. Res.* *11*, 225–236.
- Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., and Henkart, P.A. (2002). Surface Cathepsin B Protects Cytotoxic Lymphocytes from Self-destruction after Degranulation. *J. Exp. Med.* *196*, 493–503.
- Baran, K., Ciccone, A., Peters, C., Yagita, H., Bird, P.I., Villadangos, J.A., and Trapani, J.A. (2006). Cytotoxic T Lymphocytes from Cathepsin B-deficient Mice Survive Normally *in Vitro* and *in Vivo* after Encountering and Killing Target Cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 30485–30491.
- Baran, K., Dunstone, M., Chia, J., Ciccone, A., Browne, K.A., Clarke, C.J.P., Lukyanova, N., Saibil, H., Whisstock, J.C., Voskoboinik, I., et al. (2009). The Molecular Basis for Perforin Oligomerization and Transmembrane Pore Assembly. *Immunity* *30*, 684–695.
- Barbosa, M.D.F.S., Nguyen, Q.A., Tchernev, V.T., Ashley, J.A., Detter, J.C., Blaydes, S.M., Brandt, S.J., Choptai, D., Hodgman, C., Solari, R.C.E., Lovett, M., Kingsmore, S.F. (1996). Identification of the homologous beige and chediak-higashi syndrome genes. *Nature* *385*, 262–265.
- Bartok, I., Holland, S.J., Kessels, H.W., Silk, J.D., Alkhinji, M., and Dyson, J. (2010). T cell receptor CDR3 loops influence  $\alpha\beta$  pairing☆. *Mol. Immunol.* *47*, 1613–1618.
- Bashour, K.T., Gondarenko, A., Chen, H., Shen, K., Liu, X., Huse, M., Hone, J.C., and Kam, L.C. (2014). CD28 and CD3 have complementary roles in T-cell traction forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 2241–2246.
- Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination. *Cell* *109*, S45–S55.
- Batus, M., Waheed, S., Ruby, C., Petersen, L., Bines, S.D., and Kaufman, H.L. (2013). Optimal Management of Metastatic Melanoma: Current Strategies and Future Directions. *Am. J. Clin. Dermatol.* *14*, 179–194.
- Beach, D., Gonen, R., Bogin, Y., Reischl, I.G., and Yablonski, D. (2007). Dual Role of SLP-76 in Mediating T Cell Receptor-induced Activation of Phospholipase C- $\gamma$ 1. *J. Biol. Chem.* *282*, 2937–2946.
- Beal, A.M., Anikeeva, N., Varma, R., Cameron, T.O., Norris, P.J., Dustin, M.L., Sykulev, Y. (2008). Protein kinase C $\alpha$  regulates stability of the peripheral adhesion ring junction and contributes to the sensitivity of target cell lysis by CTL. *J. Immunol.* *181*, 4815–4824.
- Beal, A.M., Anikeeva, N., Varma, R., Cameron, T.O., Vasiliver-Shamis, G., Norris, P.J., Dustin, M.L., and Sykulev, Y. (2009). Kinetics of Early T Cell Receptor Signaling Regulate the Pathway of Lytic Granule Delivery to the Secretory Domain. *Immunity* *31*, 632–642.

Beatty, G.L., and Gladney, W.L. (2015). Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 21, 687–692.

Becker, JC, Hansen, Kirkin, A, Seremet, T, Zeuthen, J and Straten, PT, Guldberg, P, Grønbæk, K, Riise, M. Expanded T Cell Clonotypes Comprise High Numbers of Locally In Situ T Cell Responses Against Melanoma (1999) *J Immunol*, 163, 443-447

Bedoui, S., Heath, W.R., and Mueller, S.N. (2016). CD4<sup>+</sup> T-cell help amplifies innate signals for primary CD8<sup>+</sup> T-cell immunity. *Immunol. Rev.* 272, 52–64.

Bennett, S.R.M., Carbone, F.R., Toy, T., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1998). B Cells Directly Tolerize CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Exp. Med.* 188, 1977–1983.

Berd, D., Maguire, H.C., McCue, P., and Mastrangelo, M.J. (1990). Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients. *J. Clin. Oncol.* 8, 1858–1867.

Beresford, P.J., Xia, Z., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (1999). Granzyme A Loading Induces Rapid Cytolysis and a Novel Form of DNA Damage Independently of Caspase Activation. *Immunity* 10, 585–595.

Bertrand, F., Esquerré, M., Petit, A.-E., Rodrigues, M., Duchez, S., Delon, J., and Valitutti, S. (2010). Activation of the Ancestral Polarity Regulator Protein Kinase Cζ at the Immunological Synapse Drives Polarization of Th Cell Secretory Machinery toward APCs. *J. Immunol.* 185, 2887–2894.

Bertrand, F., Muller, S., Roh, K.-H., Laurent, C., Dupre, L., and Valitutti, S. (2013). An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 6073–6078.

Blanchard, N., Decraene, M., Yang, K., Miro-Mur, F., Amigorena, S., and Hivroz, C. (2004). Strong and Durable TCR Clustering at the T/Dendritic Cell Immune Synapse Is Not Required for NFAT Activation and IFN-γ Production in Human CD4<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* 173, 3062–3072.

Blott, E.J., and Griffiths, G.M. (2002). Secretory lysosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 122–131.

Boasberg, PD , Hoon, DSB, Piro, LD, Martin, MA, Fujimoto, A, Kristedja, TS, Bhachu, S, Ye, X, Deck, RR and O'Day, SD. Enhanced Survival Associated with Vitis Expression during Maintenance Biotherapy for Metastatic Melanoma. (2006) *Journal of Investigative Dermatology* 126, 2658–2663.

Boissonnas, A., Fetler, L., Zeelenberg, I.S., Hugues, S., and Amigorena, S. (2007). In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J. Exp. Med.* 204, 345–356.

Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem* 270, 7795-7798.

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltseve, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803–815.

- Bolitho, P., Voskoboinik, I., Trapani, J., and Smyth, M. (2007). Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 339–347.
- Bonifacino, J.S., and Glick, B.S. (2004). The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* *116*, 153–166.
- Boon, T. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *183*, 725–729.
- Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C.J.M., and Kastenmüller, W. (2018). CD4<sup>+</sup> T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 635–647.
- Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G.M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol. Rev.* *189*, 152–160.
- Bots, M., and Medema, J.P. (2006). Granzymes at a glance. *J. Cell Sci.* *119*, 5011–5014.
- Boudreau, N., and Bissell, M.J. (1998). Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 640–646.
- Breart, B., Lemaître, F., Celli, S., and Bousso, P. (2008). Two-photon imaging of intratumoral CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1390–1397.
- Brennan, A.J., Chia, J., Browne, K.A., Ciccone, A., Ellis, S., Lopez, J.A., Susanto, O., Verschoor, S., Yagita, H., Whisstock, J.C., et al. (2011). Protection from Endogenous Perforin: Glycans and the C Terminus Regulate Exocytic Trafficking in Cytotoxic Lymphocytes. *Immunity* *34*, 879–892.
- Brohl, A.S., Khushalani, N.I., Eroglu, Z., Markowitz, J., Thapa, R., Chen, Y.A., Kudchadkar, R., and Weber, J.S. (2016). A phase IB study of ipilimumab with peginterferon alfa-2b in patients with unresectable melanoma. *J. Immunother. Cancer* *4*, 85.
- Bromley, S.K., Burack, W.R., Johnson, K.G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (2001). The Immunological Synapse. *26*.
- Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F., et al. (2005). Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.* *201*, 1257–1268.
- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL. BRAF and RAS mutations in human lungcancer and melanoma. *Cancer Res.* (2002) *62*, 6997-7000.
- Bryceson, Y.T., Rudd, E., Zheng, C., Edner, J., Ma, D., Wood, S.M., Bechensteen, A.G., Boelens, J.J., Celkan, T., Farah, R.A., et al. (2007). Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11-deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients. *Blood* *110*, 1906–1915.
- Bunnell, S.C., Diehn, M., Yaffe, M.B., Findell, P.R., Cantley, L.C., and Bergi, L.J (2000). Biochemical Interactions Integrating Itk with the T Cell Receptor-initiated Signaling Cascade. *J. Bio. Chem.* *275*, 2219-2230.
- Burrows, S.R., Chen, Z., Archbold, J.K., Tynan, F.E., Beddoe, T., Kjer-Nielsen, L., Miles, J.J., Khanna, R., Moss, D.J., Liu, Y.C., et al. (2010). Hard wiring of T cell receptor specificity for the major

histocompatibility complex is underpinned by TCR adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 10608–10613.

Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, J.-K., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., et al. (2009). MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat. Cell Biol.* **11**, 56–64.

Calabro, S., Liu, D., Gallman, A., Nascimento, M.S.L., Yu, Z., Zhang, T., Chen, P., Zhang, B., Xu, L., Gowthaman, U., et al. (2016). Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity. *Cell Rep.* **16**, 2472–2485.

Cameron, T.O., Cochran, J.R., Yassine-Diab, B., Sékaly, R.-P., and Stern, L.J. (2001). Cutting Edge: Detection of Antigen-Specific CD4<sup>+</sup> T Cells by HLA-DR1 Oligomers Is Dependent on the T Cell Activation State. *J. Immunol.* **166**, 741–745.

Caramalho, Í., Faroudi, M., Padovan, E., Müller, S., and Valitutti, S. (2009). Visualizing CTL/melanoma cell interactions: multiple hits must be delivered for tumour cell annihilation. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 3834–3846.

Carreño, L.J., Bueno, S.M., Bull, P., Nathenson, S.G., and Kalergis, A.M. (2007). The half-life of the T-cell receptor/peptide-major histocompatibility complex interaction can modulate T-cell activation in response to bacterial challenge. *Immunology* **121**, 227–237.

Čemerski, S., Das, J., Locasale, J., Arnold, P., Giurisato, E., Markiewicz, M.A., Fremont, D., Allen, P.M., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S. (2007). The Stimulatory Potency of T Cell Antigens Is Influenced by the Formation of the Immunological Synapse. *Immunity* **26**, 345–355.

Čemerski, S., Das, J., Giurisato, E., Markiewicz, M.A., Allen, P.M., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S. (2008). The Balance between T Cell Receptor Signaling and Degradation at the Center of the Immunological Synapse Is Determined by Antigen Quality. *Immunity* **29**, 414–422.

Chabanon, R.M., Pedrero, M., Lefebvre, C., Marabelle, A., Soria, J.-C., and Postel-Vinay, S. (2016). Mutational Landscape and Sensitivity to Immune Checkpoint Blockers. *Clin. Cancer Res.* **22**, 4309–4321.

Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 563–572.

Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., Weiss, A. (1992). Zap-70 : a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TRC chain. *Cell* **71**, 649–662.

Chan, C., George, A.J.T., and Stark, J. (2001). Cooperative enhancement of specificity in a lattice of T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 5758–5763.

Chang, C.-H., and Pearce, E.L. (2016). Emerging concepts of T cell metabolism as a target of immunotherapy. *Nat. Immunol.* **17**, 364–368.

Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., et al. (2007). Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses. *Science* **315**, 1687–1691.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10.

Chen, J., and Chen, Z. (2014). The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer. *Med. Oncol.* **31**, 82.

Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242.

Chen, Y.A., and Scheller, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 98–106.

Cheng, X., Zhang, X., Yu, L., and Xu, H. (2015). Calcium signaling in membrane repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* **45**, 24–31.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505–512.

Cho, J., Ahn, S., Yoo, K.H., Kim, J.H., Choi, S.-H., Jang, K.-T., and Lee, J. (2016). Treatment outcome of PD-1 immune checkpoint inhibitor in Asian metastatic melanoma patients: correlative analysis with PD-L1 immunohistochemistry. *Invest. New Drugs* **34**, 677–684.

Christopher Garcia, K., Adams, J.J., Feng, D., and Ely, L.K. (2009). The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple. *Nat. Immunol.* **10**, 143–147.

Clark, W.H. (1991). Tumour progression and the nature of cancer. *Br. J. Cancer* **64**, 631.

Clark, C.E., Hasan, M., and Bouso, P. (2011). A Role for the Immediate Early Gene Product c-fos in Imprinting T Cells with Short-Term Memory for Signal Summation. *PLoS ONE* **6**, e18916.

Clark, R.H., Stinchcombe, J.C., Day, A., Blott, E., Booth, S., Bossi, G., Hamblin, T., Davies, E.G., and Griffiths, G.M. (2003). Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat. Immunol.* **4**, 1111–1120.

Clemente, C.G., Mihm Jr, M.C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer Interdiscip. Int. J. Am. Cancer Soc.* **77**, 1303–1310.

Cohnen, A., Chiang, S.C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., Janßen, O., Cerwenka, A., Bryceson, Y.T., and Watzl, C. (2013). Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* **122**, 1411–1418.

Condeelis, J., and Segall, J.E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 921–930.

Côte, M., Ménager, M.M., Burgess, A., Mahlaoui, N., Picard, C., Schaffner, C., Al-Manjomi, F., Al-Harbi, M., Alangari, A., Le Deist, F., et al. (2009). Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells. *J. Clin. Invest.* **119**, 3765–3773.

Crites, T.J., Padhan, K., Muller, J., Krogsaard, M., Gudla, P.R., Lockett, S.J., and Varma, R. (2014). TCR Microclusters Pre-Exist and Contain Molecules Necessary for TCR Signal Transduction. *J. Immunol.* **193**, 56–67.

Crotzer, V.L. (2010). Autophagy and adaptive immunity. **9**.

Crozat, K., Hoebe, K., Ugolini, S., Hong, N.A., Janssen, E., Rutschmann, S., Mudd, S., Sovath, S., Vivier, E., and Beutler, B. (2007). *Jinx*, an MCMV susceptibility phenotype caused by disruption of *Unc13d*: a mouse model of type 3 familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J. Exp. Med.* 204, 853–863.

Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M.E., Djuretic, I.M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M.G., Groner, Y., and Rao, A. (2009). Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J. Exp. Med.* 206, 51–59.

Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.* 15, 251–262.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10, 942–949.

Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and Adaptive Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* 30, 626–635.

Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 333–340.

Das, D.K., Feng, Y., Mallis, R.J., Li, X., Keskin, D.B., Hussey, R.E., Brady, S.K., Wang, J.-H., Wagner, G., Reinherz, E.L., et al. (2015). Force-dependent transition in the T-cell receptor  $\beta$ -subunit allosterically regulates peptide discrimination and pMHC bond lifetime. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 1517–1522.

Davis, L.C., Morgan, A.J., Chen, J.-L., Snead, C.M., Bloor-Young, D., Shenderov, E., Stanton-Humphreys, M.N., Conway, S.J., Churchill, G.C., Parrington, J., et al. (2012). NAADP Activates Two-Pore Channels on T Cell Cytolytic Granules to Stimulate Exocytosis and Killing. *Curr. Biol.* 22, 2331–2337.

Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y. (1998). LIGAND RECOGNITION BY  $\alpha\beta$  T CELL RECEPTORS. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 523–544.

Dell'Angelica, E.C. (1997). AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* 16, 917–928.

Dembo, M., Torney, D.C., Saxman, K., Hammer, D. (1988). The reaction limited kinetics of membrane to surface adhesion and detachment. *Proc. R. Soc. Lond. B* 234, 55–83.

Demotz, S., Grey, H., and Sette, A. (1990). The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249, 1028–1030.

Deng, A., Chen, S., Li, Q., Lyu, S., Clayberger, C., and Krensky, A.M. (2005). Granulysin, a Cytolytic Molecule, Is Also a Chemoattractant and Proinflammatory Activator. *J. Immunol.* 174, 5243–5248.

Depoil, D., Zaru, R., Guiraud, M., Chauveau, A., Harriague, J., Bismuth, G., Utzny, C., Müller, S., and Valitutti, S. (2005). Immunological Synapses Are Versatile Structures Enabling Selective T Cell Polarization. *Immunity* 22, 185–194.

Díaz, L.R., Saavedra-López, E., Romarate, L., Mitxitorena, I., Casanova, P.V., Cribaro, G.P., Gallego, J.M., Pérez-Vallés, A., Forteza-Vila, J., Alfaro-Cervello, C., et al. (2018). Imbalance of immunological synapse-kinapse states reflects tumor escape to immunity in glioblastoma. *JCI Insight* 3.



Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1, 447-456

Dolmetsch, R.E., Xu, K., Lewis, R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 833-836.

Dombroski, D., Houghtling, R.A., Labno, C.M., Precht, P., Takesono, A., Caplen, N.J., Billadeau, D.D., Wange, R.L., Burkhardt, J.K., and Schwartzberg, P.L. (2005). Kinase-Independent Functions for Itk in TCR-Induced Regulation of Vav and the Actin Cytoskeleton. *J. Immunol.* 174, 1385–1392.

Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., and Populo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther. Volume 7*, 35–49.

Donnadieu, E., Bismuth, G., and Trautmann, A. (1994). Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr. Biol.* 4, 584–595.

Donnadieu, E., Cefai, D., Tan, Y.P., Paresys, G., and Bismuth, G. Imaging early steps of human T cell activation by antigen-presenting cells. 12.

Dourmashkin, R.R., Deteix, P., Simone, C.B., and Section, P.H. Electron microscopic demonstration of lesions in target cell membranes associated with antibody-dependent cellular cytotoxicity. 7.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., et al. (2002). Cancer Regression and Autoimmunity in Patients after Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Sci. New Ser.* 298, 850–854.

Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U; ESMO Guidelines Committee. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. (2015) *Ann Oncol.* 5, 126-32

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting : from immuno-surveillance to tumor escape. (2002) *Nat Immunol.* 3, 991–998

Dushek, O., and Coombs, D. (2008). Analysis of Serial Engagement and Peptide-MHC Transport in T Cell Receptor Microclusters. *Biophys. J.* 94, 3447–3460.

Dushek, O., Mueller, S., Soubies, S., Depoil, D., Caramalho, I., Coombs, D., and Valitutti, S. (2008). Effects of Intracellular Calcium and Actin Cytoskeleton on TCR Mobility Measured by Fluorescence Recovery. *PLoS ONE* 3, e3913.

Dustin, M.L. (2008). T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol. Rev.* 221, 77–89.

Dustin, M.L. (2010). Insights into Function of the Immunological Synapse from Studies with Supported Planar Bilayers. In *Immunological Synapse*, T. Saito, and F.D. Batista, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–24.

Dustin, M.L., and Colman, D.R. (2002). Neural and Immunological Synaptic Relations. *Sci. New Ser.* 298, 785–789.

Dustin, M.L., and Long, E.O. (2010). Cytotoxic immunological synapses: NK and CTL synapses. *Immunol. Rev.* 235, 24–34.

Dustin, M.L., Bromley, S.K., Kan, Z., Peterson, D.A., and Unanue, E.R. (1997). Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3909–3913.

- Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P.A., Allen, P.M., et al. (1998). A Novel Adaptor Protein Orchestrates Receptor Patterning and Cytoskeletal Polarity in T-Cell Contacts. *Cell* **94**, 667–677.
- Ebert, L.M., and McColl, S.R. (2002). Up-Regulation of CCR5 and CCR6 on Distinct Subpopulations of Antigen-Activated CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes. *J. Immunol.* **168**, 65–72.
- Egen, J.G., and Allison, J.P. (2002). Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 Accumulation in the Immunological Synapse Is Regulated by TCR Signal Strength. *Immunity* **16**, 23–35.
- Eickhoff, S., Brewitz, A., Gerner, M.Y., Klauschen, F., Komander, K., Hemmi, H., Garbi, N., Kaisho, T., Germain, R.N., and Kastenmüller, W. (2015). Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell* **162**, 1322–1337.
- Enders, A., Zieger, B., Schwarz, K., Yoshimi, A., Speckmann, C., Knoepfle, E.-M., Kontny, U., Müller, C., Nurden, A., Rohr, J., et al. (2006). Lethal hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type II. *Blood* **108**, 81–87.
- Epping, M.T., and Bernards, R. (2006). A Causal Role for the Human Tumor Antigen Preferentially Expressed Antigen of Melanoma in Cancer. *Cancer Res.* **66**, 10639–10642.
- Ernst, B., Lee, D.-S., Chang, J.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (1999). The Peptide Ligands Mediating Positive Selection in the Thymus Control T Cell Survival and Homeostatic Proliferation in the Periphery. *Immunity* **11**, 173–181.
- Ewen, C.L., Kane, K.P., and Bleackley, R.C. (2013). Granzyme H induces cell death primarily via a Bcl-2-sensitive mitochondrial cell death pathway that does not require direct Bid activation. *Mol. Immunol.* **54**, 309–318.
- Exley, M., Wilemen, T., Mueller, B., Terhorst, C. (1995). Evidence for multivalent structure of T cell antigen receptor complex. *Mol. Immunol.* **32**, 829-839.
- Fabre, S., Lang, V., Harriague, J., Jobart, A., Unterman, T.G., Trautmann, A., and Bismuth, G. (2005). Stable Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in the T Cell Immunological Synapse Stimulates Akt Signaling to FoxO1 Nuclear Exclusion and Cell Growth Control. *J. Immunol.* **174**, 4161–4171.
- Fahmy, T.M., Bieler, J.G., Edidin, M., Schneck, J.P. (2001)). Increased TRC avidity after T cell activation : a mechanism for sensing low-density antigen. *Immunity* **14**, 135-143.
- Faroudi, M., Utzny, C., Salio, M., Cerundolo, V., Guiraud, M., Muller, S., and Valitutti, S. (2003a). Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: Manifestation of a dual activation threshold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 14145–14150.
- Faroudi, M., Zaru, R., Paulet, P., Muller, S., and Valitutti, S. (2003b). Cutting Edge: T Lymphocyte Activation by Repeated Immunological Synapse Formation and Intermittent Signaling. *J. Immunol.* **171**, 1128–1132.
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachée-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., et al. (2003). Munc13-4 Is Essential for Cytolytic Granules Fusion and Is Mutated in a Form of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* **115**, 461–473.

Feng, L., Seymour, A.B., Jiang, S., To, A., Peden, A.A., Novak, E.K., Zhen, L., Rusiniak, M.E., Eicher, E.M., Robinson, M.S., et al. The  $\beta$ 3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky–Pudlak syndrome and night blindness. 8.

Feng, Y., Brazin, K.N., Kobayashi, E., Mallis, R.J., Reinherz, E.L., and Lang, M.J. (2017). Mechanosensing drives acuity of  $\alpha\beta$  T-cell recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E8204–E8213.

Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 690–702.

FEUERER, M., ROCHA, M, BAI , L, UMANSKY, V, SOLOMAYER, EF, BASTERT, G, DIEI, J and SCHIRRMACHE, V. ENRICHMENT OF MEMORY T CELLS AND OTHER PROFOUNDIMMUNOLOGICAL CHANGES IN THE BONE MARROW FROM UNTREATED BREAST CANCER PATIENTS (2001) *Int. J. Cancer*: 92, 96–105

Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., and Puck, J.M. (1995). Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935–946.

Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Olive, D., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2012). CD8+ T Cells Specific for Tumor Antigens Can Be Rendered Dysfunctional by the Tumor Microenvironment through Upregulation of the Inhibitory Receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* 72, 887–896.

Franklin, C., Livingstone, E., Roesch, A., Schilling, B., and Schadendorf, D. (2017). Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* 43, 604–611.

Fratta, E., Coral, S., Covre, A., Parisi, G., Colizzi, F., Danielli, R., Marie Nicolay, H.J., Sigalotti, L., and Maio, M. (2011). The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol. Oncol.* 5, 164–182.

Freiberg, B.A., Kupfer, H., Maslanik, W., Delli, J., Kappler, J., Zaller, D.M., and Kupfer, A. (2002). Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat. Immunol.* 3, 911–917.

Friedl, P., Gunzer, M. (2001). Interaction of T cells with APCs : the serial encounter model. *Trends Immunol.* 22, 187-191.

Friedl, P., and Brocker, E.-B. (2002). TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunol. Rev.* 186, 83–89.

Friedl, P., den Boer, A.Th., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 532–545.

Friedman, R.S., Beemiller, P., Sorensen, C.M., Jacobelli, J., and Krummel, M.F. (2010). Real-time analysis of T cell receptors in naive cells in vitro and in vivo reveals flexibility in synapse and signaling dynamics. *J. Exp. Med.* 207, 2733–2749.

Friedmann, K.S., Bozem, M., and Hoth, M. (2019). Calcium signal dynamics in T lymphocytes: Comparing in vivo and in vitro measurements. *Semin. Cell Dev. Biol.* 94, 84–93.

Froelich, C.J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R., Babior, B., Shah, G.M., Bleackley, R.C., Dixit, V.M., and Hanna, W. (1996). New Paradigm for Lymphocyte Granule-mediated Cytotoxicity: TARGET

CELLS BIND AND INTERNALIZE GRANZYME B, BUT AN ENDOSOMOLYTIC AGENT IS NECESSARY FOR CYTOSOLIC DELIVERY AND SUBSEQUENT APOPTOSIS. *J. Biol. Chem.* 271, 29073–29079.

Fuertes Marraco, S.A., Neubert, N.J., Verdeil, G., and Speiser, D.E. (2015). Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front. Immunol.* 6.

Galván, I., Inácio, Â., Dañino, M., Corbí-Llopis, R., Monserrat, M.T., and Bernabeu-Wittel, J. (2019). High SLC7A11 expression in normal skin of melanoma patients. *Cancer Epidemiol.* 62, 101582.

Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, Grob JJ, Malvehy J, Newton-Bishop J, Stratigos AJ, Pehamberger H, Eggermont AM; European Dermatology Forum (EDF); European Association of Dermato-Oncology (EADO); European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer.* 2016, 63, 201-17.

Garcia-Borron, J.C., Sanchez-Laorden, B.L., and Jimenez-Cervantes, C. (2005). Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res.* 0, 051103015727002.

Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Pérez-Villar, J.J., López-Botet, M., Duggan-Keen, M., and Stern, P.L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 18, 89–95.

Gascoigne, N.R.J., Zal, T., Munir Alam, S. (2001). T cell receptor binding kinetics in T cell development and activation. *Exp. Rev. Mol. Med* 1-17.

Gaud, G., Lesourne, R., and Love P.E (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 485-497.

Geiger, B., Rosen, D., Berke, G. (1982). Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J. Cell. Biol* 95, 137-143.

Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., and Gerasimenko, O.V. (1998). Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr. Biol.* 8, 1335–1338.

Gerlach, C., van Heijst, J.W.J., Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R.M., Zehn, D., Bevan, M.J., Schepers, K., and Schumacher, T.N.M. (2010). One naive T cell, multiple fates in CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 207, 1235–1246.

Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 309–322.

Germain, R.N., and Stefanová, I. (1999). THE DYNAMICS OF T CELL RECEPTOR SIGNALING: Complex Orchestration and the Key Roles of Tempo and Cooperation. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 467–522.

Gerner, M.Y., Casey, K.A., Kastenmuller, W., and Germain, R.N. (2017). Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity. *J. Exp. Med.* 214, 3105–3122.

Ghiringhelli, F., Ménard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., et al. (2005a). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- $\beta$ -dependent manner. *J. Exp. Med.* 202, 1075–1085.

Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005b). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$ -secreting cells inducing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 202, 919–929.

Gibney, G.T., Weiner, L.M., and Atkins, M.B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 17, e542–e551.

Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999). Low-Affinity Ligands for the TCR Drive Proliferation of Mature CD8<sup>+</sup> T Cells in Lymphopenic Hosts. *Immunity* 11, 183–190.

Gorentla, B.K., Zhong, X.P. (2012). T cell receptor signal transduction in T lymphocytes. *Clin Cell Immunol.* 5, 1-23.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221–227.

Gravelle, P., Do, C., Franchet, C., Mueller, S., Oberic, L., Ysebaert, L., Larocca, L.M., Hohaus, S., Calmels, M.-N., Frenois, F.-X., et al. (2016). Impaired functional responses in follicular lymphoma CD8<sup>+</sup> TIM-3<sup>+</sup> T lymphocytes following TCR engagement. *OncolImmunology* 5, e1224044.

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851–857.

Green, D.R., Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626–629.

Griffiths, G.M., and Isaaz, S. (1993). Granzymes A and B Are Targeted to the Lytic Granules of Lymphocytes by the Mannose-6- Phosphate Receptor. *J. Cell Biol.* 120, 885–896.

Groom, J.R., Luster, A.D. (2011). CXCR3 ligands : redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immuno. Cell. Biol.* 89, 207-215.

Grujic, M., Braga, T., Lukinius, A., Eloranta, M.-L., Knight, S.D., Pejler, G., and Åbrink, M. (2005). Serglycin-deficient Cytotoxic T Lymphocytes Display Defective Secretory Granule Maturation and Granzyme B Storage. *J. Biol. Chem.* 280, 33411–33418.

Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.R., and Raulet, D.H. (2008). NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity* 28, 571–580.

Guida, M., Latorre, A., Mastria, A., and De Lena, M. (1996). Subcutaneous recombinant interleukin-2 plus chemotherapy with cisplatin and dacarbazine in metastatic melanoma. *Eur. J. Cancer* 32, 730–733.

Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, Trinchieri G, Colombo MP. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection (2005) *Cancer Res.* 65, 3437-46.

Gunzer, M., Borgmann, S., and Grabbe, S. Antigen Presentation in Extracellular Matrix: Interactions of T Cells with Dendritic Cells Are Dynamic, Short Lived, and Sequential. 10.

Halle, S., Keyser, K.A., Stahl, F.R., Busche, A., Marquardt, A., Zheng, X., Galla, M., Heissmeyer, V., Heller, K., Boelter, J., et al. (2016). In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T Cell Cooperativity. *Immunity* 44, 233–245.

Hammer, J.A., and Wu, X.S. (2002). Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 69–75.

Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., Chen, Z., and Cao, X. (2009). CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T Cells, a New Subset of Regulatory T Cells, Suppress T Cell Proliferation through Membrane-Bound TGF- $\beta$ 1. *J. Immunol.* 182, 111–120.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. (2000) 100, 57-70

Hanson, D. (1999). Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Mol. Immunol.* 36, 413–422.

Harrison, D.L., Fang, Y., and Huang, J. (2019). T-Cell Mechanobiology: Force Sensation, Potentiation, and Translation. *Front. Phys.* 7.

Hathcock, K.S. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 180, 631–640.

He, J.-S., and Ostergaard, H.L. (2007). CTLs Contain and Use Intracellular Stores of FasL Distinct from Cytolytic Granules. *J. Immunol.* 179, 2339–2348.

Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B–Mediated Cytochrome C Release Is Regulated by the Bcl-2 Family Members Bid and Bax. *J. Exp. Med.* 192, 1391–1402.

Henkart, P.A. (1984). Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. *J. Exp. Med.* 160, 75–93.

Herz, J., Pardo, J., Kashkar, H., Schramm, M., Kuzmenkina, E., Bos, E., Wiegmann, K., Wallich, R., Peters, P.J., Herzig, S., et al. (2009). Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 10, 761–768.

Heyn, C., Ronald, J.A., Ramadan, S.S., Snir, J.A., Barry, A.M., MacKenzie, L.T., Mikulis, D.J., Palmieri, D., Bronder, J.L., and Steeg, P.S. (2006). In vivo MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. *Magn. Reson. Med. Off. J. Int. Soc. Magn. Reson. Med.* 56, 1001–1010.

Hicklin, D.J., Marincola, F.M., and Ferrone, S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol. Med. Today* 5, 178–186.

Hiebert, P.R., and Granville, D.J. (2012). Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol. Med.* 18, 732–741.

Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Honjo, T., Okazaki, T., and Tokura, Y. (2010). Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 116, 1757–1766.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723.

Hogan, P.G. (2017). Calcium–NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion. *Cell Calcium* 63, 66–69.

Holt, O., Kanno, E., Bossi, G., Booth, S., Daniele, T., Santoro, A., Arico, M., Saegusa, C., Fukuda, M., and Griffiths, G.M. (2008). Slp1 and Slp2-a Localize to the Plasma Membrane of CTL and Contribute to Secretion from the Immunological Synapse. *Traffic* 9, 446–457.

Hong, J., Persaud, S.P., Horvath, S., Allen, P.M., Evavold, B.D., and Zhu, C. (2015). Force-Regulated In Situ TCR–Peptide-Bound MHC Class II Kinetics Determine Functions of CD4<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* 195, 3557–3564.

Hor, J.L., Whitney, P.G., Zaid, A., Brooks, A.G., Heath, W.R., and Mueller, S.N. (2015). Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cell Activation to Localized Viral Infection. *Immunity* 43, 554–565.

Hořejší, V., Zhang, W., and Schraven, B. (2004). Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 603–616.

Houghton, AN., Gold, JS., and Blachere, NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma 2001 *Current Opinion in Immunology*, 13:134–140

Hsu, M.-Y., Meier, F., and Herlyn, M. (2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differ. Rev.* 70, 522–536.

Huang, Y., Chen, Z., Jang, J.H., Baig, M.S., Bertolet, G., Schroeder, C., Huang, S., Hu, Q., Zhao, Y., Lewis, D.E., et al. (2018). PD-1 blocks lytic granule polarization with concomitant impairment of integrin outside-in signaling in the natural killer cell immunological synapse. *J. Allergy Clin. Immunol.* 142, 1311-1321.e8.

Hufford, M.M., Kim, T.S., Sun, J., Braciale, T.J. (2010). Antiviral CD8<sup>+</sup> T cell effector activities in situ are regulated by target cell type. *J. Exp. Med* 208, 167-180.

Huizing, M., Anikster, Y., and Gahl, W.A. (2000). Hermansky-Pudlak Syndrome and Related Disorders of Organelle Formation: Hermansky-Pudlak Syndrome. *Traffic* 1, 823–835.

Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 973–983.

Huppa, J.B., Gleimer, M., Sumen, C., Davis, M.M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat. Immunol.* 4 :749-755.

Huse, M., Lillemeier, B.F., Kuhns, M.S., Chen, D.S., Davis, M.M. (2006). T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat. Immunol* 7, 247-255.

Huse, M., Klein, L.O., Girvin, A.T., Faraj, J.M., Li, Q.-J., Kuhns, M.S., and Davis, M.M. (2007). Spatial and Temporal Dynamics of T Cell Receptor Signaling with a Photoactivatable Agonist. *Immunity* 27, 76–88.

Huse, M., Quann, E.J., Davis, M.M. (2008). Shouts, whispers and the kiss of death : directional secretion in T cells. *Nat. Immunol* 9, 1105-1111.

Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., and Andrews, N.W. (2008a). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca<sup>2+</sup>-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* 180, 905–914.

- Idone, V., Tam, C., and Andrews, N.W. (2008b). Two-way traffic on the road to plasma membrane repair. *Trends Cell Biol.* **18**, 552–559.
- Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**, 89–95.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular flip. *Nature* **388**, 190–195.
- Inaba, K. (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* **180**, 1849–1860.
- Irvine, D.J., and Doh, J. (2007). Synthetic surfaces as artificial antigen presenting cells in the study of T cell receptor triggering and immunological synapse formation. *Semin. Immunol.* **19**, 245–254.
- Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M., and Davis, M.M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* **419**, 845–849.
- Isaaz, S., Baetz, K., Olsen, K., Podack, E., and Griffiths, G.M. (1995). Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1071–1079.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S.-I., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233–243.
- Ives, N.J., Suci, S., Eggermont, A.M.M., Kirkwood, J., Lorigan, P., Markovic, S.N., Garbe, C., Wheatley, K., Bufalino, R., Cameron, D., et al. (2017). Adjuvant interferon- $\alpha$  for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis. *Eur. J. Cancer* **82**, 171–183.
- Jackson, H.J., Rafiq, S., and Brentjens, R.J. (2016). Driving CAR T-cells forward. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 370–383.
- Jacobs, J.F., Nierkens, S., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., and Adema, G.J. (2012). Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol.* **13**, e32–e42.
- Jenkins, M.R., Tsun, A., Stinchcombe, J.C., and Griffiths, G.M. (2009). The Strength of T Cell Receptor Signal Controls the Polarization of Cytotoxic Machinery to the Immunological Synapse. *Immunity* **31**, 621–631.
- Jenkins, R.W., Barbie, D.A., and Flaherty, K.T. (2018). Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br. J. Cancer* **118**, 9–16.
- Jenne, D., Rey, C., Haefliger, J.A., Qiao, B.Y., Groscurth, P., and Tschopp, J. (1988). Identification and sequencing of cDNA clones encoding the granule-associated serine proteases granzymes D, E, and F of cytolytic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 4814–4818.
- Jiang, J., Jin, M.-S., Kong, F., Cao, D., Ma, H.-X., Jia, Z., Wang, Y.-P., Suo, J., and Cao, X. (2013). Decreased Galectin-9 and Increased Tim-3 Expression Are Related to Poor Prognosis in Gastric Cancer. *PLoS ONE* **8**, e81799.



Jiang, N., Huang, J., Edwards, L.J., Liu, B., Zhang, Y., Beal, C.D., Evavold, B.D., and Zhu, C. (2011). Two-Stage Cooperative T Cell Receptor-Peptide Major Histocompatibility Complex-CD8 Trimolecular Interactions Amplify Antigen Discrimination. *Immunity* 34, 13–23.

Jimbow, K., Gomez, P.F., Toyofuku, K., Chang, D., Miura, S., Tsujiya, H., and Park, J.S. (1997). Biological role of tyrosinase related protein and its biosynthesis and transport from TGN to stage I melanosome, late endosome, through gene transfection study. *Pigment Cell Res.* 10, 206–213.

Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. (2014). ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair. *Science* 343, 1247136–1247136.

Johnson, D.B., Peng, C., and Sosman, J.A. (2015). Nivolumab in melanoma: latest evidence and clinical potential. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 7, 97–106.

Jongstra, J., Schall, T.J., Dyer, B.J., Clayberger, C., Jorgensen, J., Davis, M.M., Krensky, A.M. (1987). The isolation and sequence of a novel gene from a human functional T cell line. *J. Exp. Med* 165, 601–614.

Kabanova, A., Sanseviero, F., Veronica, C., Gamberucci, A., Gozzetti, A., Campoccia, G., Bocchia, M., and Baldari, C.T. (2016). Human Cytotoxic T Lymphocytes Form Dysfunctional Immune Synapses with B Cells Characterized by Non-Polarized Lytic Granule Release. *Cell Rep.* 15, 9–18.

Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 749–761.

Kaiserman, D., Bird, C.H., Sun, J., Matthews, A., Ung, K., Whisstock, J.C., Thompson, P.E., Trapani, J.A., and Bird, P.I. (2006). The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *J. Cell Biol.* 175, 619–630.

Kalergis, A.M., Boucheron, N., Doucey, M.A., Palmieri, E., Goyarts, E.C., Vegh, Z., Luescher, I.F., Nathenson, S.G. (2001). Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TRC and the pMHC complex. *Immunol. Nature* 2: 229–234.

Kallikourdis, M., Viola, A., and Benvenuti, F. (2015). Human Immunodeficiencies Related to Defective APC/T Cell Interaction. *Front. Immunol.* 6.

Kao, C., Daniels, M.A., and Jameson, S.C. (2005). Loss of CD8 and TCR binding to Class I MHC ligands following T cell activation. *Int. Immunol.* 17, 1607–1617.

Kaplan, D., Shankaran, V., Dighe, S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L., Schreiber, RD. Demonstration of an interferon g-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7556–7561  
Vol. 95

Karjalainen, K. (1994). High sensitivity, low affinity—paradox of T-cell receptor recognition. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 9–12.

Kaspar, A.A., Okada, S., Kumar, J., Poulain, F.R., Drouvalakis, K.A., Kelekar, A., Hanson, D.A., Kluck, R.M., Hitoshi, Y., Johnson, D.E., et al. (2001). A Distinct Pathway of Cell-Mediated Apoptosis Initiated by Granulysin. *J. Immunol.* 167, 350–356.

Kaufmann, T., Tai, L., Ekert, P.G., Huang, D.C.S., Norris, F., Lindemann, R.K., Johnstone, R.W., Dixit, V.M., and Strasser, A. (2007). The BH3-Only Protein Bid Is Dispensable for DNA Damage- and Replicative Stress-Induced Apoptosis or Cell-Cycle Arrest. *Cell* 129, 423–433.

Kaizuka, Y., Douglass, A., Varma, R., Dustin, M.L., Vale, R.D. (2007). Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in jurkat T cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20296-20301

Kersh, G.J., Kersh, E.N., Fremont, D.H., Allen, P.M. (1998). High and low potency ligands with similar affinities for the TCR : the importance of kinetics in tcr signaling. *Immunity* 9: 817-826.

Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2005). Perforin Triggers a Plasma Membrane-Repair Response that Facilitates CTL Induction of Apoptosis. *Immunity* 23, 249–262.

Khazen, R., Müller, S., Gaudenzio, N., Espinosa, E., Puissegur, M.-P., and Valitutti, S. (2016). Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nat. Commun.* 7, 10823.

Khazen, R., Müller, S., Lafouresse, F., Valitutti, S., and Cussat-Blanc, S. (2019). Sequential adjustment of cytotoxic T lymphocyte densities improves efficacy in controlling tumor growth. *Sci. Rep.* 9, 12308.

Kim, H., and Ronai, Z.A. (2016). HIV Drug to Aid Melanoma Therapies? *Cancer Cell* 29, 245–246.

Kim, J.R., Moon, Y.J., Kwon, K.S., Bae, J.S., Wagle, S., Kim, K.M., Park, H.S., Lee, H., Moon, W.S., Chung, M.J., et al. (2013). Tumor Infiltrating PD1-Positive Lymphocytes and the Expression of PD-L1 Predict Poor Prognosis of Soft Tissue Sarcomas. *PLoS ONE* 8, e82870.

Kim, N., Kim, M., Yun, S., Doh, J., Greenberg, P.D., Kim, T.-D., and Choi, I. (2014). MicroRNA-150 regulates the cytotoxicity of natural killers by targeting perforin-1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 195-203.e4.

Kim, S.T., Takeuchi, K., Sun, Z.-Y.J., Touma, M., Castro, C.E., Fahmy, A., Lang, M.J., Wagner, G., and Reinherz, E.L. (2009). The  $\alpha\beta$  T Cell Receptor Is an Anisotropic Mechanosensor. *J. Biol. Chem.* 284, 31028–31037.

Kim, T.-D., Lee, S.U., Yun, S., Sun, H.-N., Lee, S.H., Kim, J.W., Kim, H.M., Park, S.-K., Lee, C.W., Yoon, S.R., et al. (2011). Human microRNA-27a\* targets Prf1 and GzmB expression to regulate NK-cell cytotoxicity. *Blood* 118, 5476–5486.

Klein, C.A., and Hölzel, D. (2006). Systemic Cancer Progression and Tumor Dormancy: Mathematical Models Meet Single Cell Genomics. *Cell Cycle* 5, 1788–1798.

Klemen, N.D., Feingold, P.L., Goff, S.L., Hughes, M.S., Kammula, U.S., Yang, J.C., Schrumpp, D.S., Rosenberg, S.A., and Sherry, R.M. (2017). Metastasectomy Following Immunotherapy with Adoptive Cell Transfer for Patients with Advanced Melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* 24, 135–141.

Klemen, N.D., Wang, M., Feingold, P.L., Cooper, K., Pavri, S.N., Han, D., Detterbeck, F.C., Boffa, D.J., Khan, S.A., Olino, K., et al. (2019). Patterns of failure after immunotherapy with checkpoint inhibitors predict durable progression-free survival after local therapy for metastatic melanoma. *J. Immunother. Cancer* 7, 196.

Knuth, A., Danowski, B., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1984). T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *81*, 3511–3515.

Koning, F., Lee Maloy, W., and Coligan, J.E. (1990). The implications of subunit interactions for the structure of the T cell receptor-CD3 complex. *Eur. J. Immunol.* *20*, 299–305.

Konjar, Š., Sutton, V.R., Hoves, S., Repnik, U., Yagita, H., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, V., Turk, B., Trapani, J.A., et al. (2010). Human and mouse perforin are processed in part through cleavage by the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L: Cathepsin L mediates C-terminal perforin processing. *Immunology* *131*, 257–267.

Korn, E.L., Liu, P.-Y., Lee, S.J., Chapman, J.-A.W., Niedzwiecki, D., Suman, V.J., Moon, J., Sondak, V.K., Atkins, M.B., Eisenhauer, E.A., et al. (2008). Meta-Analysis of Phase II Cooperative Group Trials in Metastatic Stage IV Melanoma to Determine Progression-Free and Overall Survival Benchmarks for Future Phase II Trials. *J. Clin. Oncol.* *26*, 527–534.

Kotaskova, J., Tichy, B., Trbusek, M., Francova, H.S., Kabathova, J., Malcikova, J., Doubek, M., Brychtova, Y., Mayer, J., and Pospisilova, S. (2010). High Expression of Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG3) in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Associated with Unmutated Immunoglobulin Variable Heavy Chain Region (IGHV) Gene and Reduced Treatment-Free Survival. *J. Mol. Diagn.* *12*, 328–334.

Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* *407*, 789.

Krattinger, R., Ramelyte, E., Dornbierer, J., and Dummer, R. (2019). Is single versus combination therapy problematic in the treatment of cutaneous melanoma? *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 17512433.2019.1650641.

Krensky, A.M., and Clayberger, C. (2009). Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens* *73*, 193–198.

Krieg, C., Létourneau, S., Pantaleo, G., Boyman, O., and Allison, J.P. (2010). Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11906–11911.

Krönig, H., Julia Falchner, K., Odendahl, M., Brackertz, B., Conrad, H., Muck, D., Hein, R., Blank, C., Peschel, C., Haller, B., et al. (2012). PD-1 expression on Melan-A-reactive T cells increases during progression to metastatic disease. *Int. J. Cancer* *130*, 2327–2336.

Krzewski, K., and Cullinane, A.R. (2013). Evidence for defective Rab GTPase-dependent cargo traffic in immune disorders. *Exp. Cell Res.* *319*, 2360–2367.

Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G., and Coligan, J.E. (2013). LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood* *121*, 4672–4683.

Kuhn, J.R., and Poenie, M. (2002). Dynamic Polarization of the Microtubule Cytoskeleton during CTL-Mediated Killing. *Immunity* *16*, 111–121.

Kuhns, M.S., Davis, M.M., and Garcia, K.C. (2006). Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity* *24*, 133–139.

Kupfer, A., Dennert, G., Singer, S.J. (1983)). Polarization of the golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc. Natl. Acad. Sci* 80, 7224-7228.

Kupfer, A., and Dennert, G. REORIENTATION OF THE MICROTUBULE-ORGANIZING CENTER AND THE GOLGI APPARATUS IN CLONED CYTOTOXIC LYMPHOCYTES TRIGGERED BY BINDING TO LYSABLE TARGET CELLS'. 6.

Kupfer, A., Mosmann, T.R., and Kupfer, H. (1991). Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 775–779.

Kurts, C. (2010). Cross-priming in health and disease. 12.

Kwong, J. Hrs binds SNAP-25 and regulates secretion. 12.

Lagrue, K., Carisey, A., Oszmiana, A., Kennedy, P.R., Williamson, D.J., Cartwright, A., Barthen, C., and Davis, D.M. (2013). The central role of the cytoskeleton in mechanisms and functions of the NK cell immune synapse. *Immunol. Rev.* 256, 203–221.

Langer, E.M., Kendersky, N.D., Daniel, C.J., Kuziel, G.M., Pelz, C., Murphy, K.M., Capecchi, M.R., and Sears, R.C. (2018). ZEB1-repressed microRNAs inhibit autocrine signaling that promotes vascular mimicry of breast cancer cells. *Oncogene* 37, 1005–1019.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2002). Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 982–987.

Law, R.H.P., Lukyanova, N., Voskoboinik, I., Caradoc-Davies, T.T., Baran, K., Dunstone, M.A., D'Angelo, M.E., Orlova, E.V., Coulibaly, F., Verschoor, S., et al. (2010). The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* 468, 447–451.

Lawrence, R.E., and Zoncu, R. (2019). The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat. Cell Biol.* 21, 133–142.

Le Gal, F, Avril, MF, Bosq, J, Lefebvre, P, Deschemin, JC, Andrieu, M, Dore, MX and Guillet, JG. Direct Evidence to Support the Role of Antigen-Specific CD8+ T Cells in Melanoma-Associated Vitiligo (2001) *J Invest Dermatol* 117, 1464±1470

Letourneur, F., Klausner, R.D. (1992). Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3. *Science* 255, 79-82.

Letourneur, F., Klausner, R.D. (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69, 1143-1157.

Lee, K.-H. (2002). T Cell Receptor Signaling Precedes Immunological Synapse Formation. *Science* 295, 1539–1542.

Lee, K.-H., Dinner, A.R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T.N., Burack, W.R., Wu, H., and Wang, J. (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 302, 1218–1222.

Leung, C., Hodel, A.W., Brennan, A.J., Lukyanova, N., Tran, S., House, C.M., Kondos, S.C., Whisstock, J.C., Dunstone, M.A., Trapani, J.A., et al. (2017). Real-time visualization of perforin nanopore assembly. *Nat. Nanotechnol.* 12, 467–473.

Leupin, O., Zaru, R., Laroche, T., Müller, S., and Valitutti, S. (200) Exclusion of CD45 from the T cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes. *Curr. Bio.* 10, 277-281

Lever, M., Maini, P.K., van der Merwe, P.A., and Dushek, O. (2014). Phenotypic models of T cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 619–629.

Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* 12, 406–414.

Li J, Wang Y, Liang R, An X, Wang K, Shen G, Tu Y, Zhu J, Tao J. Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma. *Nanomedicine.* (2015) 11, 769-94.

Liao, D., Wang, M., Liao, Y., Li, J., and Niu, T. (2019). A Review of Efficacy and Safety of Checkpoint Inhibitor for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Front. Pharmacol.* 10, 609.

Liu, S.K., Fang, N., Koretzky G.A., and McGlade, C. (1998). The hematopoietic-specific adaptor protein Gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol.* 9, 67-75

Lillemeier, B.F., Mörtelmaier, M.A., Forstner, M.B., Huppa, J.B., Groves, J.T., and Davis, M.M. (2010). TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. *Nat. Immunol.* 11, 90–96.

Lim, T.S., Mortellaro, A., Lim, C.T., Hämmerling, G.J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2011). Mechanical Interactions between Dendritic Cells and T Cells Correlate with T Cell Responsiveness. *J. Immunol.* 187, 258–265.

Linsley, P.S. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173, 721–730.

Liu, B., Chen, W., Evavold, B.D., and Zhu, C. (2014). Accumulation of Dynamic Catch Bonds between TCR and Agonist Peptide-MHC Triggers T Cell Signaling. *Cell* 157, 357–368.

Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D.L., and Vignali, D.A. (2000). On the dynamics of TCR: CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13, 665–675.

LivingstoneE, ZimmerL, VaubelJ, SchadendorfD  
BRAF, MEK and KIT inhibitors for melanoma: adverse events and their management. *Chin Clin.Oncol.* (2014) 3, 29

Lloyd-Evans, E., Morgan, A.J., He, X., Smith, D.A., Elliot-Smith, E., Sillence, D.J., Churchill, G.C., Schuchman, E.H., Galione, A., and Platt, F.M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.* 14, 1247–1255.

Lomakina, E.B., and Waugh, R.E. (2010). Signaling and Dynamics of Activation of LFA-1 and Mac-1 by Immobilized IL-8. *Cell. Mol. Bioeng.* 3, 106–116.

Lopez, J.A., Brennan, A.J., Whisstock, J.C., Voskoboinik, I., and Trapani, J.A. (2012). Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol.* 33, 406–412.

- Lopez, J.A., Susanto, O., Jenkins, M.R., Lukoyanova, N., Sutton, V.R., Law, R.H., Johnston, A., Bird, C.H., Bird, P.I., and Whisstock, J.C. (2013a). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood* **121**, 2659–2668.
- Lopez, J.A., Jenkins, M.R., Rudd-Schmidt, J.A., Brennan, A.J., Danne, J.C., Mannering, S.I., Trapani, J.A., and Voskoboinik, I. (2013b). Rapid and Unidirectional Perforin Pore Delivery at the Cytotoxic Immune Synapse. *J. Immunol.* **191**, 2328–2334.
- Lupetti, R., Pisarra, P., Verrecchia, A., Farina, C., Nicolini, G., Anichini, A., Bordignon, C., Sensi, M., Parmiani, G., and Traversari, C. (1998). Translation of a Retained Intron in Tyrosinase-related Protein (TRP) 2 mRNA Generates a New Cytotoxic T Lymphocyte (CTL)-defined and Shared Human Melanoma Antigen Not Expressed in Normal Cells of the Melanocytic Lineage. *J. Exp. Med.* **188**, 1005–1016.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 622–632.
- Lyubchenko, T.A., Wurth, G.A., and Zweifach, A. (2001). Role of Calcium Influx in Cytotoxic T Lymphocyte Lytic Granule Exocytosis during Target Cell Killing. *Immunity* **15**, 847–859.
- Ma, J.S.Y., Monu, N., Shen, D.T., Mecklenbräuker, I., Radoja, N., Haydar, T.F., Leitges, M., Frey, A.B., Vukmanović, S., and Radoja, S. (2007). Protein Kinase C $\delta$  Regulates Antigen Receptor-Induced Lytic Granule Polarization in Mouse CD8<sup>+</sup> CTL. *J. Immunol.* **178**, 7814–7821.
- Ma, J.S.Y., Haydar, T.F., and Radoja, S. (2008). Protein Kinase C  $\delta$  Localizes to Secretory Lysosomes in CD8<sup>+</sup> CTL and Directly Mediates TCR Signals Leading to Granule Exocytosis-Mediated Cytotoxicity. *J. Immunol.* **181**, 4716–4722.
- Ma, Z., Discher, D.E., and Finkel, T.H. (2012). Mechanical Force in T Cell Receptor Signal Initiation. *Front. Immunol.* **3**.
- Maciejko, L., Smalley, M., and Goldman, A. (2017). Cancer Immunotherapy and Personalized Medicine: Emerging Technologies and Biomarker Based Approaches. *J. Mol. Biomark. Diagn.* **08**.
- Maeurer, M.J., Gollin, S.M., Martin, D., Swaney, W., Bryant, J., Castelli, C., Robbins, P., Parmiani, G., Storkus, W.J., and Lotze, M.T. (1996). Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J. Clin. Invest.* **98**, 1633–1641.
- Mahnke, Y., Schwendemann, J., Beckhove, P., Schirmacher, V. Maintenance of long-term tumour-specific T-cell memory by residual dormant tumour cells. (2005) *Immunology.* **115**, 325–36
- Makedonas, G., Banerjee, P.P., Pandey, R., Hersperger, A.R., Sanborn, K.B., Hardy, G.A.D., Orange, J.S., and Betts, M.R. (2009). Rapid Up-Regulation and Granule-Independent Transport of Perforin to the Immunological Synapse Define a Novel Mechanism of Antigen-Specific CD8<sup>+</sup> T Cell Cytotoxic Activity. *J. Immunol.* **182**, 5560–5569.
- Maldonado, R.A., Irvine, D.J., Schreiber, R., and Glimcher, L.H. (2004). A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* **431**, 527–532.
- Manolios, N., Letourneur, F., Bonifacio, J.S., and Klausner, R.D. (1991). Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. *EMBO J.* **10**, 1643–1651.

- Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 231–237.
- Marshall, B.T., Long, M., Piper, J.W., Yago, T., McEver, R.P., Zhu, C. (2003). Direct observation of catch bonds involving cell adhesion molecules. *Nature* 423, 190-193.
- Masson, D., Tschopp, J. (1987). A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* 49, 679-685.
- Matsui, K., Boniface, J.J., Reay, P.A., Schild, H., Groth, B.F.D.St., and Davis, M.M. (1991). Low Affinity Interaction of Peptide-MHC Complexes with T Cell Receptors. *Sci. New Ser.* 254, 1788–1791
- Matsuzaway, A., Takeda, Y., Ozawa, H. Survival of leukemic cells in a dormant state following cyclophosphamide-induced cure of strongly immunogenic mouse leukemia. (1991) *Int. J. Cancer*: 49, 303-309 .
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045.
- McKenzie, M.D., Carrington, E.M., Kaufmann, T., Strasser, A., Huang, D.C.S., Kay, T.W.H., Allison, J., and Thomas, H.E. (2008). Proapoptotic BH3-Only Protein Bid Is Essential For Death Receptor-Induced Apoptosis of Pancreatic -Cells. *Diabetes* 57, 1284–1292.
- McGavern D.B., Christen, U. and Oldstone M.B.A (2002) Molecular anatomy of antigen-specific CD8+T cells engagement and synapse formation *in vivo*. *Nat. Immunol.* 3, 918-925.
- McNeil, P. (2009). Membrane repair redux: redox of MG53. *Nat. Cell Biol.* 11, 7–9.
- McNeil, P.L. (1993). Cellular and molecular adaptations to injurious mechanical stress. *Trends Cell Biol.* 3, 302–307.
- McNeil, P.L., and Khakee, R. (1992). Disruptions of Muscle Fiber Plasma Membranes. 140, 13.
- McNeil, P.L., and Kirchhausen, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 499–505.
- McNeil, P.L., Vogel, S.S., Miyake, K., and Terasaki, M. (2000). Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *J Cell Sci* 113, 1891–1902.
- McVey Ward, D., Griffiths, G.M., Stinchcombe, J.C., and Kaplan, J. (2000). Analysis of the Lysosomal Storage Disease Chediak-Higashi Syndrome: Analysis of Chediak-Higashi Syndrome. *Traffic* 1, 816–822.
- Melero, I., Grimaldi, A.M., Perez-Gracia, J.L., and Ascierto, P.A. (2013). Clinical Development of Immunostimulatory Monoclonal Antibodies and Opportunities for Combination. *Clin. Cancer Res.* 19, 997–1008.
- Meller, N., Elitzur, Y., and Isakov, N. Protein Kinase C- $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) Distribution Analysis in Hematopoietic Cells: Proliferating T Cells Exhibit High Proportions of PKC $\zeta$  in the Particulate Fraction. 9.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154.

Ménager, M.M., Ménasché, G., Romao, M., Knapnougél, P., Ho, C.-H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2007). Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat. Immunol.* 8, 257–267.

Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., et al. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25, 173–176.

Menasche, G., Feldmann, J., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2005). Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunol. Rev.* 203, 165–179.

Ménasché, G., Feldmann, J., Fischer, A., and De Saint Basile, G. (2005). Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunol. Rev.* 203, 165–179.

Ménasché, G., Ménager, M.M., Lefebvre, J.M., Deutsch, E., Athman, R., Lambert, N., Mahlaoui, N., Court, M., Garin, J., Fischer, A., et al. (2008). A newly identified isoform of Slp2a associates with Rab27a in cytotoxic T cells and participates to cytotoxic granule secretion. *Blood* 112, 5052–5062.

Merhavi-Shoham, E., Itzhaki, O., Markel, G., Schachter, J., and Besser, M.J. (2017). Adoptive Cell Therapy for Metastatic Melanoma: *Cancer J.* 23, 48–53.

van der Merwe, P.A., and Dushek, O. (2011). Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 47–55.

Metkar, S.S., Menaa, C., Pardo, J., Wang, B., Wallich, R., Freudenberg, M., Kim, S., Raja, S.M., Shi, L., Simon, M.M., et al. (2008). Human and Mouse Granzyme A Induce a Proinflammatory Cytokine Response. *Immunity* 29, 720–733.

Metkar, S.S., Marchioretto, M., Antonini, V., Lunelli, L., Wang, B., Gilbert, R.J., Anderluh, G., Roth, R., Pooga, M., Pardo, J., et al. (2015). Perforin oligomers form arcs in cellular membranes: a locus for intracellular delivery of granzymes. *Cell Death Differ.* 22, 74–85.

Metkar, S.S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S.M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J.A., and Froelich, C.J. Cytotoxic Cell Granule-Mediated Apoptosis: Perforin Delivers Granzyme B-Serglycin Complexes into Target Cells without Plasma Membrane Pore Formation. 12.

Miguel, G.F., Alarcon, B., Iglesias, A., Bluethmann, H., Alvarez-Mon, M., Sanz, E., DeLaHera, A. (1999). Multivalent structure of an  $\alpha\beta$ T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 1547-1552.

Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, Alteri R, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, (2016). *CA Cancer J Clin*, 66:271-289

Miller, M.J., Hejazi, A.S., Wei, S.H., Cahalan, M.D., and Parker, I. (2004). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 998–1003.

Miller, M.J., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan M.D (2004) Imaging the Single Cell Dynamics of CD4<sub>T</sub> Cell Activation by Dendritic Cells in Lymph Nodes. *J. Exp. Med* 200, 847-856



- Mo, X., Preston, S., and Zaidi, M.R. (2019). Macroenvironment-gene-microenvironment interactions in ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 1–54.
- Monks, C.R.F., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–86.
- Moon, H., Donahue, L.R., Choi, E., Scumpia, P.O., Lowry, W.E., Grenier, J.K., Zhu, J., and White, A.C. (2017). Melanocyte Stem Cell Activation and Translocation Initiate Cutaneous Melanoma in Response to UV Exposure. *Cell Stem Cell* **21**, 665-678.e6.
- Moreau, H.D., Lemaître, F., Terriac, E., Azar, G., Piel, M., Lennon-Dumenil, A.-M., and Bousso, P. (2012). Dynamic In Situ Cytometry Uncovers T Cell Receptor Signaling during Immunological Synapses and Kinapses In Vivo. *Immunity* **37**, 351–363.
- Morgan, A.J., and Galione, A. (2014). Two-pore channels (TPCs): Current controversies: Prospects & Overviews. *BioEssays* **36**, 173–183.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M.J., Heibei, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F.B., et al. (2000). Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B during Cytotoxic T Cell-Induced Apoptosis. *Cell* **103**, 491–500.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. (1996). Flice, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-827.
- Nagle, D.L., Karim, M.A., Woolf, E.A., Holmgren, L., Bork, P., Misumi, D.J., McGrail, S.H., Dussault, B.J., Perou, C.M., Boissy, R.E., Duyk, G.M., Spritz, R.A., Moore, K.J. (1996). Identification and mutation analysis of the complete gene for chediak-higashi syndrome. *Nat. Genet.* **14**, 307-311.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355–365.
- Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C., and Iwasaki, A. (2009). CD8+ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4+ T-cell help. *Nature* **462**, 510–513.
- Nassef Kadry Naguib Roufaiel, M., Wells, J.W., and Steptoe, R.J. (2015). Impaired T-Cell Function in B-Cell Lymphoma: A Direct Consequence of Events at the Immunological Synapse? *Front. Immunol.* **6**.
- Naumov, G.N., Akslen, L.A., and Folkman, J. (2006). Role of Angiogenesis in Human Tumor Dormancy: Animal Models of the Angiogenic Switch. *Cell Cycle* **5**, 1779–1787.
- Neefjes, J., Jongsma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823–836.
- Negulescu, P.A., Krasieva, T.B., Khan, A., Kerschbaum, H.H., and Cahalan, M.D. (1996). Polarity of T Cell Shape, Motility, and Sensitivity to Antigen. *Immunity* **4**, 421–430.
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K., and Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 123–132.

- Nishi, T., and Forgac, M. (2002). The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases — nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 94–103.
- Norcross, M.A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 135, 113–134.
- Ochsenbein, A.F. (2005). Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin. Immunopathol.* 27, 19–35.
- O'Keefe, J.P., Blaine, K., Alegre, M.-L., and Gajewski, T.F. (2004). Formation of a central supramolecular activation cluster is not required for activation of naive CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 9351–9356.
- Overstreet, M.G., Freyberger, H., Cockburn, I.A., Chen, Y.-C., Tse, S.-W., and Zavala, F. (2009). CpG-enhanced CD8<sup>+</sup> T-cell responses to peptide immunization are severely inhibited by B cells. *Eur. J. Immunol.* 40, 124–133.
- Palmer, E., and Naeher, D. (2009). Affinity threshold for thymic selection through a T-cell receptor–co-receptor zipper. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 207–213.
- Panelli, M.C., Wunderlich, J., Jeffries, J., Wang, E., Mixon, A., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M. (2000). Phase 1 Study in Patients With Metastatic Melanoma of Immunization With Dendritic Cells Presenting Epitopes Derived From the Melanoma-Associated Antigens MART-1 and gp100: *J. Immunother.* 23, 487–498.
- Pao, L.I., Sumaria, N., Kelly, J.M., Dommelen, S. van, Cretney, E., Wallace, M.E., Anthony, D.A., Uldrich, A.P., Godfrey, D.I., Papadimitriou, J.M., et al. (2005). Functional Analysis of Granzyme M and Its Role in Immunity to Infection. *J. Immunol.* 175, 3235–3243.
- Pardo, J., Aguilo, J.I., Anel, A., Martin, P., Joeckel, L., Borner, C., Wallich, R., Müllbacher, A., Froelich, C.J., and Simon, M.M. (2009). The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect.* 11, 452–459.
- Patsoukis, N., Brown, J., Petkova, V., Liu, F., Li, L., and Boussiotis, V.A. (2012). Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. *Sci. Signal.* 5, ra46–ra46.
- Peña, S.V., and Krensky, A.M. (1997). Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin. Immunol.* 9, 117–125.
- Perera, R.M., and Zoncu, R. (2016). The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 223–253.
- Peters, P.J. (1991). Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* 173, 1099–1109.
- Pfeifhofer-Obermair, C., Thuille, N., and Baier, G. (2012). Involvement of distinct PKC gene products in T cell functions. *Front. Immunol.* 3.
- Pham, C.T.N., and Ley, T.J. (1999). Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8627–8632.

Pham, C.T.N., Ivanovich, J.L., Raptis, S.Z., Zehnbauer, B., and Ley, T.J. (2004). Papillon-Lefèvre Syndrome: Correlating the Molecular, Cellular, and Clinical Consequences of Cathepsin C/Dipeptidyl Peptidase I Deficiency in Humans. *J. Immunol.* *173*, 7277–7281.

Piao, Y.-R., Piao, L.-Z., Zhu, L.-H., Jin, Z.-H., and Dong, X.-Z. (2013). Prognostic Value of T Cell Immunoglobulin Mucin-3 in Prostate Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *14*, 3897–3901.

Pipkin, M.E., Rao, A., and Lichtenheld, M.G. (2010). The transcriptional control of the perforin locus: Perforin transcription. *Immunol. Rev.* *235*, 55–72.

Podack, E.R., Young, J.D., and Cohn, Z.A. (1985). Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *82*, 8629–8633.

de Poot, S.A.H., and Bovenschen, N. (2014). Granzyme M: behind enemy lines. *Cell Death Differ.* *21*, 359–368.

Powell, W.C., Fingleton, B., Wilson, C.L., Boothby, M., and Matrisian, L.M. (1999). The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr. Biol.* *9*, 1441–1447.

Praper, T., Beseničar, M.P., Istinič, H., Podlesek, Z., Metkar, S.S., Froelich, C.J., and Anderluh, G. (2010). Human perforin permeabilizing activity, but not binding to lipid membranes, is affected by pH. *Mol. Immunol.* *47*, 2492–2504.

Prins, D., and Michalak, M. (2011). Organellar Calcium Buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a004069–a004069.

Purbhoo, M.A., Irvine, D.J., Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2004). T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.* *5*, 524–530.

Pusztai, L., Karn, T., Safonov, A., Abu-Khalaf, M.M., and Bianchini, G. (2016). New Strategies in Breast Cancer: Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* *22*, 2105–2110.

Rabinowitz, J.D., Beeson, C., Wulfig, C., Tate, K., Allen, P.M., Davis, M.M., McConnell, H.M. (1996). Altered T cell receptor ligands trigger a subset of early Tcell signals. *Immunity*, *5* :125-135.

Raedler, L.A. (2015). Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *8*, 4.

Rafique, I., Kirkwood, J.M., and Tarhini, A.A. (2015). Immune Checkpoint Blockade and Interferon- $\alpha$  in Melanoma. *Semin. Oncol.* *42*, 436–447.

Ramsay, A.G., Johnson, A.J., Lee, A.M., Gorgün, G., Le Dieu, R., Blum, W., Byrd, J.C., and Gribben, J.G. (2008). Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J. Clin. Invest.* JCI35017.

Ramsay, A.G., Clear, A.J., Kelly, G., Fatah, R., Matthews, J., MacDougall, F., Lister, T.A., Lee, A.M., Calaminici, M., and Gribben, J.G. (2009). Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood* *114*, 4713–4720.

Randriamampita, C., and Trautmann, A. (2004). Ca<sup>2+</sup> signals and T lymphocytes “New mechanisms and functions in Ca<sup>2+</sup> signalling.” *Biol. Cell* *96*, 69–78.

Rao, S.K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., and Andrews, N.W. (2004). Identification of SNAREs Involved in Synaptotagmin VII-regulated Lysosomal Exocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 20471–20479.

Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2014). *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 42, D503–D509.

Reddy, A., Caler, E.V., and Andrews, N.W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106, 157–169.

Reiman, J.M., Kmiecik, M., Manjili, M.H., and Knutson, K.L. (2007). Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* 17, 275–287.

Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., and Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2, 925–931.

Ribas, A. (2010). Clinical Development of the Anti-CTLA-4 Antibody Tremelimumab. *Semin. Oncol.* 37, 450–454.

Ribas, A., Comin-Anduix, B., Economou, J.S., Donahue, T.R., de la Rocha, P., Morris, L.F., Jalil, J., Dissette, V.B., Shintaku, I.P., Glaspy, J.A., et al. (2009). Intratumoral Immune Cell Infiltrates, FoxP3, and Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Patients with Melanoma Undergoing CTLA4 Blockade. *Clin. Cancer Res.* 15, 390–399.

Richendollar, B.G., Pohlman, B., Elson, P., and Hsi, E.D. (2011). Follicular programmed death 1–positive lymphocytes in the tumor microenvironment are an independent prognostic factor in follicular lymphoma. *Hum. Pathol.* 42, 552–557.

Richie, L.I., Ebert, P.J.R., Wu, L.C., Krummel, M.F., Owen, J.J.T., and Davis, M.M. Imaging Synapse Formation during Thymocyte Selection: Inability of CD3 $\zeta$  to Form a Stable Central Accumulation during Negative Selection. 12.

Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I., Debatin, K., Fischer, A., and de Villartay, J. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347–1349.

Rieux-Laucat, F., Fischer, A., and Deist, F.L. (2003). Cell-death signaling and human disease. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 325–331.

Riley, J.L. (2009). PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol. Rev.* 229, 114–125.

Robert, C., Schachter, J., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 372, 2521–2532.

Roh, M.R., Zheng, Z., Kim, H.S., Jeung, H.-C., Rha, S.Y., and Chung, K.Y. (2013). Difference of interferon- $\alpha$  and interferon- $\beta$  on melanoma growth and lymph node metastasis in mice: Melanoma Res. 23, 114–124.

Romero, P., Valmori, D., Pittet, M.J., Zippelius, A., Rimoldi, D., Lévy F., Dutoit, V., Ayyoub, M., Rubio-Godoy, V., Michielin, O., Guillaume, P., Batard, P., Luescher, I.F., Lejeune, F., Liénard, D., Rufer, N., Dietrich, P.Y., Speiser, D.E., Cerottini, J.C. (2002). Antigenicity and immunogenicity of melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol. Rev.* 188, 80–96.

Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348, 62–68.

Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A.J.M., Boeckeler, K., and Parker, P.J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 103–112.

Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* 229, 12–26.

Ruder, C., Reimer, T., Delgado-Martinez, I., Hermosilla, R., Engelsberg, A., Nehring, R., Dorken, B., Rehm, A. (2005). EBAG9 adds a new layer of control on large dense-core vesicle exocytosis via interaction with snapin. *Mol. Biol. Cell* 16, 1245–1257.

Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24, 419–466.

Ruffo, E., Malacarne, V., Larsen, S.E., Das, R., Patrussi, L., Wülfing, C., Biskup, C., Kapnick, S.M., Verbist, K., Tedrick, P., et al. Inhibition of diacylglycerol kinase restores restimulation-induced cell death and reduces immunopathology in XLP-1. 15.

Sahin, U., Türeci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 11810–11813.

de Saint Basile, G., and Fischer, A. (2001). The role of cytotoxicity in lymphocyte homeostasis. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 549–554.

de Saint Basile, G., Ménasché, G., and Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 568–579.

Samelson, L.E., Patel, M.D., Weissman, A.M., Harford, L.B., Klausner, R.D. (1986). Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 46, 1083–1090.

Sanlorenzo, M., Vujic, I., Carnevale-Schianca, F., Quaglino, P., Gammaitoni, L., Fierro, M.T., Aglietta, M., and Sangiolo, D. (2017). Role of interferon in melanoma: old hopes and new perspectives. *Expert Opin. Biol. Ther.* 17, 475–483.

Saudemont, A., Quesnel, B. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. (2004) *Blood.* 104, 2124–33

Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976.

Schamel, W.W.A., Arechaga, I., Risueño, R.M., van Santen, H.M., Cabezas, P., Risco, C., Valpuesta, J.M., and Alarcón, B. (2005). Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J. Exp. Med.* 202, 493–503.

Schamel, W.W.A., Risueño, R.M., Minguet, S., Ortíz, A.R., and Alarcón, B. (2006). A conformation- and avidity-based proofreading mechanism for the TCR–CD3 complex. *Trends Immunol.* 27, 176–182.

Schreiber, RD., Old, LJ., Smyth, MJ.. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. (2011) *SCIENCE* VOL 331, 1565-1570

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.

Schubert, D.A., Gordo, S., Sabatino, J.J., Vardhana, S., Gagnon, E., Sethi, D.K., Seth, N.P., Choudhuri, K., Reijonen, H., Nepom, G.T., et al. (2012). Self-reactive human CD4 T cell clones form unusual immunological synapses. *J. Exp. Med.* 209, 335–352.

Schumacher, T.N.M. (2002). T-cell-receptor gene therapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 512–519.

Schwartzberg, P.L., Mueller, K.L., Qi, H., and Cannons, J.L. (2009). SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 39–46.

Schwartzentruber, D.J., Richards, J.M., Miller, D.M., Riley, L., Kendra, K.L., Kuzel, T.M., Whitman, E.D., Kaufman, H., Rosenberg, S.A., and Hwu, P. (2011). gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 9.

Seabra, M.C., and Coudrier, E. (2004). Rab GTPases and Myosin Motors in Organelle Motility: Rab GTPases in Organelle Transport. *Traffic* 5, 393–399.

Semenza, G. Targeting HIF-1 for cancer therapy (2003) *Nature Reviews Cancer* volume 3, pages721–732

Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 283–296.

Shain, A.H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., et al. (2015). The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N. Engl. J. Med.* 373, 1926–1936.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. (2001) *Nature* 410, 1107-1111

Shatursky, O., Heuck, A.P., Shepard, L.A., Rossjohn, J., Parker, M.W., Johnson, A.E., and Tweten, R.K. The Mechanism of Membrane Insertion for a Cholesterol-Dependent Cytolysin: A Novel Paradigm for Pore-Forming Toxins. 7.

Sherman, E., Barr, V., Manley, S., Patterson, G., Balagopalan, L., Akpan, I., Regan, C.K., Merrill, R.K., Sommers, C.L., Lippincott-Schwartz, J., et al. (2011). Functional Nanoscale Organization of Signaling Molecules Downstream of the T Cell Antigen Receptor. *Immunity* 35, 705–720.

Shi, L. (1992). Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J. Exp. Med.* 176, 1521–1529.

Shi, L., Mai, S., Israels, S., Browne, K., Trapani, J.A., and Greenberg, A.H. (1997). Granzyme B (GraB) Autonomously Crosses the Cell Membrane and Perforin Initiates Apoptosis and GraB Nuclear Localization. *J. Exp. Med.* 185, 855–866.

Shim, S., Merrill, S.A., and Hanson, P.I. (2008). Novel Interactions of ESCRT-III with LIP5 and VPS4 and their Implications for ESCRT-III Disassembly. *Mol. Biol. Cell* 19, 2661–2672.

Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M.G., Rimoldi, M., Biswas, S.K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.* 18, 349–355.

Simon, M.M., Hausmann, M., Tran, T., Ebnet, K., Tschopp, J., ThaHla, R., and Müllbacher, A. (1997). In Vitro– and Ex Vivo–derived Cytolytic Leukocytes from Granzyme A × B Double Knockout Mice Are Defective in Granule-mediated Apoptosis but not Lysis of Target Cells. *J. Exp. Med.* 186, 1781–1786.

Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., and Coyle, A.J. (2010). HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 367–388.

Speeckaert, R., van Geel, N., Vermaelen, K.V., Lambert, J., Van Gele, M., Speeckaert, M.M., and Brochez, L. (2011). Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy: Immune reactions in melanocytic lesions. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 334–344.

Spritz, R.A. (1998). Molecular genetics of the Hermansky-Pudlak and Chediak-Higashi syndromes. *Platelets* 9, 21–29.

zur Stadt, U. (2005). Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum. Mol. Genet.* 14, 827–834.

zur Stadt, U., Rohr, J., Seifert, W., Koch, F., Grieve, S., Pagel, J., Strauß, J., Kasper, B., Nürnberg, G., Becker, C., et al. (2009). Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Type 5 (FHL-5) Is Caused by Mutations in Munc18-2 and Impaired Binding to Syntaxin 11. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 482–492.

Staveley-O’Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 1178–1183.

Štefanová, I., Hemmer, B., Vergelli, M., Martin, R., Biddison, W.E., and Germain, R.N. (2003). TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat. Immunol.* 4, 248–254.

Stemberger, C., Huster, K.M., Koffler, M., Anderl, F., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2007). A Single Naive CD8+ T Cell Precursor Can Develop into Diverse Effector and Memory Subsets. *Immunity* 27, 985–997.

Stepp, S.E. (1999). Perforin Gene Defects in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Science* 286, 1957–1959.

Stinchcombe, J.C., Page, L.J., and Griffiths, G.M. (2000). Secretory Lysosome Biogenesis in Cytotoxic T Lymphocytes from Normal and Chediak Higashi Syndrome Patients. *Traffic* 1, 435–444.

Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G.M. (2001a). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751–761.

Stinchcombe, J.C., Barral, D.C., Mules, E.H., Booth, S., Hume, A.N., Machesky, L.M., Seabra, M.C., and Griffiths, G.M. (2001b). Rab27a Is Required for Regulated Secretion in Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Cell Biol.* 152, 825–834.

Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G.M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462–465.

Stone, J.D., Chervin, A.S., and Kranz, D.M. (2009). T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* 126, 165–176.

Straus, S.E. (2001). The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98, 194–200.

Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T., and Nagata, S. (1997). Membrane Fas Ligand Kills Human Peripheral Blood T Lymphocytes, and Soluble Fas Ligand Blocks the Killing. *J. Exp. Med.* 186, 2045–2050.

Sukumar, M., Liu, J., Ji, Y., Subramanian, M., Crompton, J.G., Yu, Z., Roychoudhuri, R., Palmer, D.C., Muranski, P., Karoly, E.D., et al. (2013). Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8<sup>+</sup> T cell memory and antitumor function. *J. Clin. Invest.* 123, 4479–4488.

Susanto, O., Stewart, S.E., Voskoboinik, I., Brasacchio, D., Hagn, M., Ellis, S., Asquith, S., Sedelies, K.A., Bird, P.I., Waterhouse, N.J., et al. (2013). Mouse granzyme A induces a novel death with writhing morphology that is mechanistically distinct from granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 20, 1183–1193.

Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., and Trapani, J.A. (2000). Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B–Mediated Caspase Activation. *J. Exp. Med.* 192, 1403–1414.

Sutton, V.R., Wowk, M.E., Cancilla, M., and Trapani, J.A. (2003). Caspase Activation by Granzyme B Is Indirect, and Caspase Autoprocessing Requires the Release of Proapoptotic Mitochondrial Factors. *Immunity* 18, 319–329.

Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T.J., and Eisen, H.N. (1996). Evidence that a single peptide–MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* 4, 565–571.

Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., and Andrews, N.W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J. Cell Biol.* 189, 1027–1038.

Tardieu, M., Lacroix, C., Neven, B., Bordigoni, P., Basile, G. de S., Blanche, S., and Fischer, A. (2005). Progressive neurologic dysfunctions 20 years after allogeneic bone marrow transplantation for Chediak-Higashi syndrome. *Blood* 106, 40–42.

Taube, J.M., Anders, R.A., Young, G.D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T.L., Chen, S., Klein, A.P., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., et al. (2012). Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci. Transl. Med.* 4, 127ra37–127ra37.

Tchernev, V.T., Mansfield, T.A., Giot, L., Kumar, A.M., Nandabalan, K., Li, Y., Mishra, V.S., Detter, J.C., Rothberg, J.M., Wallace, M.R., et al. (2002). The Chediak-Higashi Protein Interacts with SNARE Complex and Signal Transduction Proteins. *Mol. Med.* 8, 56–64.

Telang, S., Rasku, M.A., Clem, A.L., Carter, K., Klarer, A.C., Badger, W.R., Milam, R.A., Rai, S.N., Pan, J., Gragg, H., et al. (2011). Phase II trial of the regulatory T cell-depleting agent, denileukin diftitox, in patients with unresectable stage IV melanoma. *BMC Cancer* 11, 515.

Testori A, Ribero S, Bataille V. Diagnosis and treatment of in transit melanoma metastases. (2017) *Eur J Surg Onco* 43., 544–560



Thauland, T.J., and Parker, D.C. (2010). Diversity in immunological synapse structure: Immunological synapse diversity. *Immunology* 131, 466–472.

Thiery, J., Keefe, D., Saffarian, S., Martinvalet, D., Walch, M., Boucrot, E., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2010). Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* 115, 1582–1593.

Thompson, C.B., Lindsten, T., Ledbetter, J.A., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J.M., and June, C.H. (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 1333–1337.

Thompson, R.H., Dong, H., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Cheville, J.C., and Kwon, E.D. (2007). PD-1 Is Expressed by Tumor-Infiltrating Immune Cells and Is Associated with Poor Outcome for Patients with Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13, 1757–1761.

Tilley, S.J., Orlova, E.V., Gilbert, R.J.C., Andrew, P.W., and Saibil, H.R. (2005). Structural Basis of Pore Formation by the Bacterial Toxin Pneumolysin. *Cell* 121, 247–256.

Timmerman, L.A., Clipstone, N.A., Ho, S.N., Northrop, J.P., Crabtree, G.R. (1996). Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression. *Nature* 383, 837–840.

Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., and Sharpe, A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541–547.

Tourret, M., Guégan, S., Chemin, K., Dogniaux, S., Miro, F., Bohineust, A., and Hivroz, C. (2010). T Cell Polarity at the Immunological Synapse Is Required for CD154-Dependent IL-12 Secretion by Dendritic Cells. *J. Immunol.* 185, 6809–6818.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 735–747.

Trautmann, A., and Valitutti, S. (2003). The diversity of immunological synapses. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 249–254.

Tundo, G.R., Sbardella, D., Lacal, P.M., Graziani, G., and Marini, S. (2019). On the Horizon: Targeting Next-Generation Immune Checkpoints for Cancer Treatment. *Chemotherapy* 64, 62–80.

Uellner, R. (1997). Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J.* 16, 7287–7296.

Umansky, V., and Sevko, A. (2012). Overcoming immunosuppression in the melanoma microenvironment induced by chronic inflammation. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 275–282.

Utzny, C., Faroudi, M., and Valitutti, S. (2005). Frequency Encoding of T-Cell Receptor Engagement Dynamics in Calcium Time Series. *Biophys. J.* 88, 1–14.

Valenzano Menada M, Moiola M, Garaventa A, Nozza P, Foppiano M, Trimarchi N, Fulcheri E. Spontaneous regression of transplacental metastases from maternal melanoma in a newborn: case report and review of the literature. (2010) *Melanoma Res.* 20, 443–9

Valitutti, S. (1995). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.* 181, 577–584.

Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375, 148-151.

Valitutti, S., Lanzavecchia, A. (1997). Serial triggering of TCRs : a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Rev Immunol. Today* 18: 299-304.

Valitutti, S. (2008). Immunological Synapse: Center of Attention Again. *Immunity* 29, 384–386.

van den Wijngaard R<sup>1</sup>, Wankowicz-Kalinska A, Pals S, Weening J, Das P. Autoimmune melanocyte destruction in vitiligo. (2001) *Lab Invest* 81, 1061-7

van Zeijl MC, van den Eertwegh AJ, Haanen JB, Wouters MW. (Neo)adjuvant systemic therapy for melanoma.(2017) *Eur J Surg Oncol* 43(3):534-543

Vance, K.W., and Goding, C.R. (2004). The Transcription Network Regulating Melanocyte Development and Melanoma. *Pigment Cell Res.* 17, 318–325.

Vankempen, L. (2003). The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur. J. Cell Biol.* 82, 539–548.

Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M.L. (2006). T Cell Receptor-Proximal Signals Are Sustained in Peripheral Microclusters and Terminated in the Central Supramolecular Activation Cluster. *Immunity* 25, 117–127.

Vasconcelos, Z., Müller, S., Guipouy, D., Yu, W., Christophe, C., Gadat, S., Valitutti, S., and Dupré, L. (2015). Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intracloal Heterogeneity during Sustained Killing. *Cell Rep.* 11, 1474–1485.

Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., Bolen, J.B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinases. *Cell* 55, 301-308.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271.

Viguier, M., Lemaître, F., Verola, O., Cho, M.-S., Gorochoy, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P., and Ferradini, L. (2004). Foxp3 Expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Regulatory T Cells Are Overrepresented in Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes and Inhibit the Function of Infiltrating T Cells. *J. Immunol.* 173, 1444–1453.

Viret, C., Wong, F.S., and Janeway, C.A. Designing and Maintaining the Mature TCR Repertoire: the Continuum of Self-Peptide:Self-MHC Complex Recognition. 10.

Voskoboinik, I., Smyth, M.J., and Trapani, J.A. (2006). Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 940–952.

Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 388–400.

Vyas, J.M. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. 12.

Walch, M., Dotiwala, F., Mulik, S., Thiery, J., Kirchhausen, T., Clayberger, C., Krensky, A.M., Martinvalet, D., and Lieberman, J. (2014). Cytotoxic Cells Kill Intracellular Bacteria through Granulysin-Mediated Delivery of Granzymes. *Cell* 157, 1309–1323.

Walker, L.S.K., and Sansom, D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 852–863.

Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Boldin, M.P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 331-367.

Walsh, L., and Roy, D. (2014). Candidate prognostic markers in breast cancer: focus on extracellular proteases and their inhibitors. *Breast Cancer Targets Ther.* 81.

Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1, 405–413.

Wang, H., Kadlecsek, T.A., Au-Yeung, B.B., Goodfellow, H.E.S., Hsu, L.Y., Freedman, T.S., and Weiss, A. (2010). ZAP-70: An Essential Kinase in T-cell Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002279–a002279.

Wang, Z., Zheng, Q., Zhang, H., Bronson, R.T., Madsen, J.C., Sachs, D.H., Huang, C.A., and Wang, Z. (2017). Ontak-like human IL-2 fusion toxin. *J. Immunol. Methods* 448, 51–58.

Wardenburg, J.B., Fu, C., Jackman, J.K., Flotow, H., Wilkinson, S.E., Williams, D.H., Johnson, R., Kong, G., Chan, A.C., and Findell, P.R. (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 Protein-tyrosine Kinase Is Required for T-cell Receptor Function. *J. Biol. Chem.* 271, 19641–19644.

Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion. *Cell* 92, 759–772.

Weide, B., Martens, A., Wistuba-Hamprecht, K., Zelba, H., Maier, L., Lipp, H.-P., Klumpp, B.D., Soffel, D., Eigentler, T.K., and Garbe, C. (2017). Combined treatment with ipilimumab and intratumoral interleukin-2 in pretreated patients with stage IV melanoma—safety and efficacy in a phase II study. *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 441–449.

Weide, B., Martens, A., Wistuba-Hamprecht, K., Zelba, H., Maier, L., Lipp, H.-P., Klumpp, B.D., Soffel, D., Eigentler, T.K., and Garbe, C. (2017). Combined treatment with ipilimumab and intratumoral interleukin-2 in pretreated patients with stage IV melanoma—safety and efficacy in a phase II study. *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 441–449.

Wenzel, J., Bekisch, B., Uerlich, M., Haller, O., Bieber, T., and Tüting, T. (2005). Type I Interferon–Associated Recruitment of Cytotoxic Lymphocytes: A Common Mechanism in Regressive Melanocytic Lesions. *Am. J. Clin. Pathol.* 124, 37–48.

Wheelock, EF, Weinhold, KJ, Levich, J. The Tumor Dormant State. (1981) *Advances in Cancer Research* 34, 107-140

White, DE., Kurpios, NA., Zuo, D., Hassell, JA., Blaess, S., Mueller, U, and Muller, WJ  
Targeted disruption of  $\alpha_1$ -integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. (2004) *Cancer cell* 6, 159-170

Widakowich C<sup>1</sup>, de Castro G Jr, de Azambuja E, Dinh P, Awada A. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. (2007) *Oncologist.* 12, 1443-55

- Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M., and Valitutti, S. (2006). Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 10985–10990.
- Wilson, S.M., Yip, R., Swing, D.A., O’Sullivan, T.N., Zhang, Y., Novak, E.K., Swank, R.T., Russell, L.B., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2000). A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 7933–7938.
- Wood, S.M., Meeths, M., Chiang, S.C.C., Bechensteen, A.G., Boelens, J.J., Heilmann, C., Horiuchi, H., Rosthøj, S., Rutynowska, O., Winiarski, J., et al. (2009). Different NK cell-activating receptors preferentially recruit Rab27a or Munc13-4 to perforin-containing granules for cytotoxicity. *Blood* *114*, 4117–4127.
- Wu, X., and Hammer, J.A. (2014). Melanosome transfer: it is best to give and receive. *Curr. Opin. Cell Biol.* *29*, 1–7.
- Xia, A., Zhang, Y., Xu, J., Yin, T., and Lu, X.-J. (2019). T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front. Immunol.* *10*, 1719.
- Xiong, W., Chen, Y., Kang, X., Chen, Z., Zheng, P., Hsu, Y.-H., Jang, J.H., Qin, L., Liu, H., Dotti, G., et al. (2018). Immunological Synapse Predicts Effectiveness of Chimeric Antigen Receptor Cells. *Mol. Ther.* *26*, 963–975.
- Yan, X., Zhang, S., Deng, Y., Wang, P., Hou, Q., and Xu, H. (2018). Prognostic Factors for Checkpoint Inhibitor Based Immunotherapy: An Update With New Evidences. *Front. Pharmacol.* *9*, 1050.
- Yannelli, J.R., Sullivan, J.A., Mandell, G.L., and Engelhard, V.H. Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. *7*.
- Yi, J.S., Cox, M.A., and Zajac, A.J. (2010). T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion: T-cell exhaustion. *Immunology* *129*, 474–481.
- Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., and Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* *209*, 1201–1217.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 47–59.
- Young, J.D. (1987). Dissociation of membrane binding and lytic activities of the lymphocyte pore-forming protein (perforin). *J. Exp. Med.* *165*, 1371–1382.
- Young, J.D.-E., Leong, L.G., Liu, C.-C., Damiano, A., Wall, D.A., and Cohn, Z.A. (1986). Isolation and characterization of a serine esterase from cytolytic T cell granules. *Cell* *47*, 183–194.
- Yu, S., Li, A., Liu, Q., Li, T., Yuan, X., Han, X., and Wu, K. (2017). Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J. Hematol. Oncol.* *10*, 78.
- Yuan, J., Jiang, B., Zhao, H., and Huang, Q. (2014). Prognostic implication of TIM-3 in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasma* *61*, 35–40.

Zanin-Zhorov, A., Dustin, M.L., and Blazar, B.R. (2011). PKC- $\theta$  function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting. *Trends Immunol.* 32, 358–363.

Zaru, R., Cameron, T.O., Stern, L.J., Müller, S., and Valitutti, S. (2002). Cutting Edge: TCR Engagement and Triggering in the Absence of Large-Scale Molecular Segregation at the T Cell-APC Contact Site. *J. Immunol.* 168, 4287–4291.

Zhang, W., Sloane-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., Samelson L.E. (1998) LAT: The ZAP-70 Tyrosine Kinase Substrate that Links T Cell Receptor to Cellular Activation. *Cell* 92, 83-92.

Zhang, M., Park, S.-M., Wang, Y., Shah, R., Liu, N., Murmann, A.E., Wang, C.-R., Peter, M.E., and Ashton-Rickardt, P.G. (2006). Serine Protease Inhibitor 6 Protects Cytotoxic T Cells from Self-Inflicted Injury by Ensuring the Integrity of Cytotoxic Granules. *Immunity* 24, 451–461.

Zhao, J., Benlekbi, S., and Rubinstein, J.L. (2015). Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature* 521, 241–245.

Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H., Lenardo, M.J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, 348-351.

Zhong, X.P., Guo, R., Zhou, H., Liu, C., Wan, C.K. (2008). Diacylglycerol kinases in immune cell function and self-tolerance. *Immunol. Rev.* 224, 249-264.

Zhu, Y., Yao, S., and Chen, L. (2011). Cell Surface Signaling Molecules in the Control of Immune Responses: A Tide Model. *Immunity* 34, 466–478.

Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 263–274.

(1961). Lysis of Homologous Cells by Sensitized Lymphocytes in Tissue Culture<sup>2</sup>. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*

(1996). An $\alpha\beta$  T Cell Receptor Structure at 2.5 Å and Its Orientation in the TCR-MHC Complex  
Authors(s): K. Christopher Garcia, Massimo Degano, Robyn L. Stanfield, Anders Brunmark, Michael R. Jackson, Per A. Peterson, Luc Teyton and Ian A. Wilson. *Sci. New Ser.* 274, 209–219.

(2009). Cancer Immunity (5 June 2009) Vol. 9, p. 5. *Cancer Immun.* 9, 8.

## **Les mécanismes moléculaires de résistance des cellules de mélanome à l'attaque des lymphocytes T cytotoxiques à la synapse immunologique**

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire contre les cellules tumorales. Ils induisent l'apoptose de leurs cellules cibles par la sécrétion de granules lytiques dans une zone spécialisée appelée synapse immunologique (SI). Cette capacité lytique place les CTL au cœur de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer la réponse immunitaire des patients contre les cellules tumorales. Ces stratégies sont prometteuses mais nécessitent encore des améliorations pour être bénéfiques à un plus grand nombre de patients et pour limiter les effets secondaires. Nous avons émis l'hypothèse que l'efficacité limitée des CTL contre les tumeurs est le résultat d'un déséquilibre entre leur capacité à tuer et des mécanismes de résistance à cette attaque, intrinsèque aux cellules tumorales.

Pour étudier cette hypothèse, l'équipe s'est concentrée sur les mécanismes moléculaires déclenchés à la SI formée par les CTL et les cellules de mélanome. Cet axe de recherche a conduit à la mise en évidence de la résistance des cellules de mélanome à l'attaque des CTL par un nouveau mécanisme de défense qui passe par la sécrétion de leurs lysosomes, entraînant une dégradation de la perforine à la synapse lytique (SL).

Mon projet visait à comprendre la cinétique de réponse et les mécanismes moléculaires impliqués dans cette défense synaptique. Tout d'abord, par une approche de cytométrie en flux, nous avons pu démontrer que la formation de pores par la perforine déclenche des mécanismes de réparation membranaire dans les cellules de mélanome. Puis par une approche de microscopie en temps réel, nous avons observé que ces mécanismes sont localisés dans la zone de contact avec les CTL. Nous nous sommes ensuite intéressés au signal permettant aux cellules de mélanome de détecter l'attaque du CTL, nous avons pu mettre en évidence, par vidéomicroscopie ultra-rapide, la formation de gradients de  $\text{Ca}^{2+}$  qui démarrent à la SL, au cours des premières minutes de contact avec le CTL par les pores formés par la perforine à la membrane plasmique. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la cinétique et de la localisation de l'exposition des lysosomes par les cellules de mélanome durant ces premières minutes. Pour cela, nous avons exprimé dans des cellules de mélanome le marqueur de lysosome CD107a couplé à une protéine fluorescente sensible au pH. Ces expériences permettant de visualiser en temps réel l'exposition lysosomale à la membrane plasmique ont montré que dès les premières minutes de contact, les cellules de mélanome sont capables d'exposer rapidement leurs lysosomes à la SL, avant même la polarisation complète de la machinerie lytique du CTL. Enfin, nous avons pu mettre en évidence que l'altération de la signalisation calcique par traitement pharmacologique ou par la diminution de l'expression de la synaptotagmine VII (une protéine SNARE  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante) augmente la sensibilité des cellules de mélanome à l'attaque des CTL.

L'ensemble de ces résultats démontrent que les cellules de mélanome utilisent des mécanismes de réparation membranaire pour se défendre rapidement de l'attaque des CTL. Ils mettent également en évidence un rôle protecteur inattendu de la signalisation calcique dans les cellules tumorales. Enfin, cette étude révèle une nouvelle implication de la sécrétion lysosomale dans la résistance des tumeurs à la surveillance immunitaire. Interférer avec la résistance synaptique des cellules de mélanome pourrait ainsi être une stratégie complémentaire aux stratégies thérapeutiques actuelles visant à potentialiser l'activité du CTL afin d'améliorer leur efficacité.