

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Présentée par :
Anthony Lefebvre

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Discipline : Aspect moléculaire et cellulaire de la Biologie
Spécialité : Immunologie

IMPACT DES EXOSOMES TUMORAUX DE CARCINOME DU NASOPHARYNX SUR LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES : ÉTUDE PHÉNOTYPIQUE, FONCTIONNELLE ET PHYSIOPATHOLOGIQUE

Directeur de Thèse : **Dr Olivier Moralès**

Soutenue publiquement le 15 Février 2023

Devant le jury composé de :

Dr Steffi Bösch (HDR)

Dr Henri Gruffat (HDR)

Pr Filoména Conti

Pr Nadira Delhem

Dr Pierre Busson

Dr Olivier Moralès

ONIRIS - laboratoire IECM

CIRI - Université Lyon 1

Université Pierre-et-Marie-Curie

Université de Lille

Gustave Roussy

CNRS – laboratoire OncoThAi

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Examinateur

Directeur de Thèse

« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements »

Charles Darwin

À mes parents,
À mon frère,
À David, Nicolas, Martin et Alan,
À Alice !

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser mes remerciements aux membres de mon jury de thèse qui ont accepté de prendre de leur temps afin d'évaluer mes travaux de thèse. Merci tout particulièrement aux Dr. **Steffi Bosch** et **Henri Gruffat Henri** qui ont accepté d'être les rapporteurs de l'aboutissement de ces trois années de thèse. Je tiens également à remercier les Pr. **Filoména Conti** et **Nadira Delhem** ainsi que le Dr. **Pierre Busson** d'avoir accepté d'être examinateurs de ces travaux. C'est un réel plaisir de pouvoir partager ces travaux avec les membres de ce jury, experts dans leurs domaines respectifs et de compter sur leurs avis.

Pr Nadira Delhem, je ne pourrais jamais assez-vous remercier pour toute votre implication tout au long de cette thèse. Sans votre confiance et votre encadrement sans faille, cette thèse n'aurait pas été aussi aboutie. Merci pour tout le temps que vous avez su m'accorder pendant ces trois années. L'expression « le hasard fait bien les choses » prend tout son sens, lorsque l'on sait que je n'aurai pas dû être retenu pour réaliser mon stage de Master 1 au sein de votre laboratoire. J'espère que mes travaux et cette thèse ont été à la hauteur de vos espérances.

Dr Olivier Moralès, c'est un honneur d'avoir pu poursuivre ces travaux à vos côtés tout au long de cette thèse. Merci infiniment pour votre confiance, votre aide et vos connaissances qui m'ont permis de toujours progresser et innover dans ce sujet de thèse. La vie est bien faite, lorsque l'on sait que je n'aurai pas dû faire de stage de Master avec vous et que me voilà cinq ans après à clôturer ma thèse. Ces trois années de thèse ont été très enrichissantes et ont fait de moi le jeune chercheur que je suis aujourd'hui.

Aux collaborateurs

Je remercie le **Professeur Jérôme Kluza** ainsi que **William Laine** avec qui j'ai eu l'opportunité et le plaisir de travailler sur la partie métabolisme de ces travaux de thèse. Merci à vous pour votre disponibilité, votre bonne humeur tout au long de nos interactions.

Je tiens à remercier le **Dr Hélène Bauderlique** pour son accompagnement et sa formation en cytométrie en flux qui m'a permis d'être autonome tout au long de ma thèse. Merci pour ta disponibilité à chacune de mes questions depuis mon Master II jusqu'à la fin de cette thèse.

Aux **Dr. Elisabeth Werkmeister** ainsi qu'à **Sophie Salomé-Desnoulez**, merci pour votre implication sur le projet et plus particulièrement sur toute la partie microscopie. Sans votre aide je n'aurai pas pu réaliser les différents travaux de microscopie de ce projet ainsi que les différentes analyses. Grâce à vous nous avons pu gagner un temps précieux dans la mise en place et la réalisation de nos expérimentations de chimioattraction.

Un grand merci au **Pr. Delphine Allorge** et au **Dr. Benjamin Hennart** pour leur collaboration et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail de thèse. Benjamin, tu m'as aidé à mieux comprendre la complexité de l'HPLC.

Aux membres du laboratoire

Guillaume, on est arrivé quasiment en même temps au laboratoire. Moi en tant qu'étudiant de Master II et toi en tant que Post-Doc. Dès ton arrivée tu as su me conseiller à tous les niveaux et m'apporter ton aide au projet. Très rapidement nous nous sommes entendus aux travers de nos projets respectifs et en tant qu'ami. Toutes nos pauses café nous ont permis de faire connaissance et de partager nos points de vue, bientôt rejoint par notre troisième caféinomane. Je sors de cette thèse grand grâce à tes conseils, à ton amitié et ton soutien sans faille pendant ces trois ans. En plus d'être toujours de bons conseils tu es une personne sur qui on peut toujours compter et qui porte un grand intérêt à tous les projets du laboratoire. J'espère pourvoir assister aux beaux projets professionnels et personnels qui t'attendent.

Clément, troisième compatriote de notre trio de caféinomane, notre passion commune pour le café et les blagues à deux balles nous a soudée rapidement. Ta bonne humeur et ton dévouement sont de réelles forces. Ta spontanéité au sein du labo est plus qu'appréciable et font de toi une personne sur qui on peut toujours compter. Tu as toutes les qualités pour continuer dans la recherche et j'espère que tu pourras continuer parmi nous aussi longtemps que possible. Si jamais un jour par hasard il te prenait l'envie de faire une thèse, promis je te paierai une statue hippopotame pour ton appartement !!

Camille, une gentillesse à toutes épreuves ! Tu as été l'une de mes premières stagiaires d'abord pendant ta première année de Master puis en Master II. Ce fut un réel plaisir de pouvoir travailler avec toi. Je ne peux être qu'heureux de savoir que le projet perdurera entre de bonnes mains, les tiennes. Je te remercie pour ton aide toutes ces années que ce soit à 6h du matin

comme à 20h après les créneaux de cytométrie ! Ne doutes jamais de tes capacités, tu as tout d'une bonne doctorante et tu porteras parfaitement ce projet.

Léa, ou devrais-je dire Docteur ! Merci pour ton soutien tout au long de cette thèse au travers de tous nos échanges. Ta rigueur et ta curiosité te permettront d'aller au bout de ton sujet je n'en doute pas. Je suis très heureux de rester encore quelques mois avec vous, on aura sûrement l'occasion de reprendre nos habitudes de course à pied !

Mel, tout comme pour Camille j'ai eu la chance de t'encadrer lors de ton tout premier stage au laboratoire et je suis très heureux de te voir encore parmi nous. Tu es quelqu'un de travailleur et passionné et je suis convaincu que tu réussiras dans ce monde. Merci pour ta bonne humeur et ton soutien qui sont de réels atouts au laboratoire.

Florian, Bastien, nous avons fait connaissance lors de votre arrivée en Master II recherche l'année dernière. Ce fut un réel plaisir de pouvoir travailler et échanger avec vous. Je tiens à vous remercier tous les deux pour tous vos conseils d'une grande sagesse et votre soutien encore présent aujourd'hui. De collègue de laboratoire vous êtes devenue des amis. J'espère que nous aurons la chance de continuer à échanger autour d'après-midi jeux de société ou autour d'une bière en jouant aux fléchettes.

Cindy, nous avons fait connaissance au cours de ma thèse au moment de la fusion de nos deux laboratoires. Tu es la bonne humeur du laboratoire, toujours souriante de bonne humeur et un soutien sans faille. Je te remercie énormément pour tout ton soutien et tes conseils.

Bertrand, merci pour ton aide sur le projet et notamment sur la partie expérimentation animale. Nos différents échanges et nos références cinématographiques essentiellement à Kaamelott ont permis de faire passer plus rapidement ces longues expérimentations.

Sarah, Alexandre, Clara, Martha, je vous remercie pour toute l'aide que vous m'avez apporté depuis mon arrivée au laboratoire en Master. Nous avons pu partager quelques années ensemble au laboratoire qui m'ont permis de grandir sur le plan professionnel.

Je tiens à remercier également tous les autres membres du laboratoire pour leur soutien pendant ces trois années de travail, leur aide quotidienne m'a été grandement bénéfique.

À mes amis

Nicolas, Alan, Martin, nous nous sommes rencontrés sur les bancs de la fac il y a maintenant 6 ans. Nous avons partagé tant d'aventure entre les cours à la fac, les verres aux bars et les soirées jeux de société. Nous avons toujours été là les uns pour les autres bien avant le commencement de nos thèses respectives. Plus que des amis, vous êtes des frères et je suis très fier de vous compter à mes côtés.

À ma famille

À mes parents, merci pour votre soutien sans faille depuis tant d'années, je vous suis reconnaissant pour toute l'aide que vous m'avez apporté. Vous avez toujours été des oreilles attentives et compréhensives face aux doutes qui ont pu me traverser pendant mes trois années de thèse. Merci pour la rigueur de travail que vous avez su me transmettre qui chaque jour un peu plus me fait me dépasser.

Vincent, depuis l'autre bout de Lille ou l'Italie tu as toujours été attentif à mon travail, à vouloir échanger malgré nos domaines d'études opposés. Merci pour ce soutien et l'intérêt que tu as toujours porté à mon quotidien de thésard.

David, il est loin le temps où nous étions ensemble à l'équitation, plein d'insouciance. Merci d'avoir toujours été un ami, un frère sur lequel j'ai pu compter depuis tant d'années, à 8 kilomètres ou à 990 kilomètres tu n'étais jamais loin pour me soutenir. Encore un grand merci d'avoir fait le déplacement depuis Marseille pour être à mes côtés en ce jour si important pour moi.

Alice, merci infiniment pour tout. Merci d'être là pour moi, merci de me soutenir en toutes circonstances et de partager tous nos moments. C'est à tes côtés que j'ai commencé cette thèse, tu as été un soutien considérable jusqu'à la fin et j'ai hâte de découvrir à tes côtés ce que nous réserve la suite de cette magnifique aventure.

Table des matières :

Remerciements	4
Table des matières :	8
Liste des figures	14
Liste des tableaux	16
Liste des abréviations	17
Préambule	21
INTRODUCTION	23
I- Exosomes	23
A. Biogenèse	23
B. Marqueurs caractéristiques et composition.....	27
C. Les exosomes comme outils thérapeutiques.....	29
i. Les exosomes comme biomarqueurs diagnostics et pronostics	29
ii. Les exosomes comme cibles ou véhicules de traitement	30
D. Exosomes tumoraux	32
E. Rôle dans la carcinogenèse et la régulation de la réponse immunitaire au CNP .	34
i. Rôles dans le développement du CNP	34
ii. Rôles dans l'immunorégulation liée au CNP	36
II- Le Carcinome du Nasopharynx.....	38
A. Généralités et stade de développement du CNP	38
B. Épidémiologie	40
C. Étiologie.....	41
i. Facteurs de risques non viraux	42
a) Prédispositions génétiques	42
b) Facteurs environnementaux : Style de vie.....	43
c) Facteurs environnementaux : Alimentation	44
ii. Facteurs de risques viraux : virus d'Epstein-Barr (EBV).....	45
a) Mise en évidence d'EBV.....	45
b) Épidémiologie	46
c) Caractéristiques générales	47
d) Cycle de vie d'EBV.....	48
1. Phase lytique d'EBV	49

2.	Phase de latence d'EBV	50
e)	Réponse immune contre EBV	51
1.	Réponse Immunitaire innée contre EBV	51
2.	Réponse immunitaire adaptative contre EBV	55
f)	Échappement immunitaire d'EBV	57
1.	Échappement durant la phase lytique d'EBV.....	57
2.	Échappement pendant la phase de latence d'EBV	58
g)	Carcinome du nasopharynx et EBV	61
iii.	Modèle de la pathogenèse du CNP.....	62
D.	Prises en charge des CNP	63
i.	Traitements conventionnels.....	63
a)	Chirurgie.....	63
b)	Radiothérapie.....	64
c)	Chimiothérapie	64
ii.	Immunothérapies dans le CNP	66
a)	Immunothérapies ciblant directement EBV	66
b)	Immunothérapies ciblant les défenses immunitaires.....	67
E.	Microenvironnement tumoral.....	72
i.	Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)	74
ii.	Les cellules myéloïdes infiltrant la tumeur (TIMs).....	75
iii.	La galectine-9	76
iv.	Les lymphocytes T régulateurs.....	78
III-	Cellules Dendritiques	80
A.	Origine et classification des cellules dendritiques	80
i.	Ontogénie	80
ii.	Différentes classes de DC.....	82
a)	Cellules dendritiques conventionnelles (cDC).....	82
b)	Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)	83
c)	Cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC)	84
B.	Différents états phénotypiques et fonctionnels des DC	85
i.	Cellules dendritiques immatures (iDC).....	85
ii.	Cellules dendritiques matures (mDC)	86
iii.	Cellules dendritiques tolérogènes (tDC)	89
a)	Caractéristiques	89
b)	Génération des tDC in vitro.....	90
c)	Propriétés régulatrices des tDC	91
1.	Suppression de la réponse T effectrice par les tDC.....	91
2.	Induction de Treg par les tDC	92
iv.	Cellules dendritiques mature régulatrices (mregDC).....	93
C.	Métabolisme des Cellules Dendritiques.....	94
i.	Les grandes voies métaboliques	94

ii. Métabolisme des cellules dendritiques en fonction de leur activation.....	96
IV- Objectifs de la thèse	100
MATERIELS ET METHODES	102
A. Production et caractérisation des exosomes de CNP	102
i. Lignée cellulaire de CNP	102
ii. Production des exosomes tumoraux de CNP	102
iii. Isolement des exosomes	102
iv. Caractérisation des exosomes par Microscopie Électronique	103
v. Caractérisation des exosomes par TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing)	103
vi. Exosomes dérivés de patients atteints d'un CNP	104
B. Analyse protéique par Western Blot	104
C. Isolement des PBMCs	105
D. Tests de prolifération des PBMCs	105
E. Isolement des cellules immunitaires (monocytes et lymphocytes)	106
F. Génération des cellules dendritique dérivées de monocytes (moDC).....	106
G. Test MLR (Mixed Leukocytes Reaction) co-culture DC/LTCD3	107
H. Analyse des MoDCs par cytométrie en flux.....	108
I. Dosage des cytokines par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	108
J. Dosage par HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	110
K. Mesure du métabolisme par Seahorse.....	111
L. RT-qPCR.....	111
i. Extraction d'ARN.....	111
ii. Rétro-transcription des ARNm.....	112
iii. PCR en temps réel sur l'appareil Ari Mx	112
iv. Expression des donnés.....	112
M. Test de chimioattraction in vitro des moDC	114
N. Analyses statistiques.....	115
RESULTATS	117
Partie I : Effet des exosomes tumoraux de CNP sur le développement des cellules dendritiques humaines	117
A. Production et caractérisation des vésicules extracellulaires.....	117
i. Production des vésicules extracellulaires de CNP	117
ii. Caractérisation morphologique et phénotypique des EVs	119
iii. Caractérisation fonctionnelle des ExoC15	120

B. Caractéristiques fonctionnelles, phénotypiques et métaboliques des cellules dendritiques générées en présence des ExoC15.....	121
i. Génération des DC dérivées de monocytes en présence d'ExoC15.....	121
ii. Propriétés immunosuppressives des DC générées avec les ExoC15	122
iii. Étude du phénotype des DC générées en présence des ExoC15.....	123
a) Impact des ExoC15 sur la différenciation des moDC	123
b) Impact des ExoC15 sur la maturation des moDC	124
iv. Étude transcriptomique des DCExoC15 après maturation.....	126
v. Propriétés immunorégulatrices des DCExoC15 <i>via</i> le sécrétome.....	128
a) Mécanismes d'immunorégulation durant la différenciation des mo-DC	128
b) Modification des propriétés activatrices des moDC après maturation.....	130
vi. Effet des ExoC15 sur le métabolisme des DC générées en leur présence	133
a) Métabolisme oxydatif mitochondriale des moDC.....	133
b) Métabolisme glycolytique des moDC	134
Partie II : Effet des exosomes C15 de CNP sur l'attraction des moDC	137
A. Rationnel de la chimioattraction des moDC par les ExoC15	137
B. Étude de la chimioattraction des moDC par vidéo-microscopie.....	138
i. Méthodes d'études de la migration des DC par vidéo-microscopie en temps réel	138
ii. Chimioattraction des moDC par les ExoC15 de CNP.....	139
Partie III : Effet des exosomes de patients de CNP sur les moDC	144
A. Caractérisation des EVs de patients CNP et de Donneurs Sains.....	144
i. Caractérisation morphologique et phénotypique des EVs	144
ii. Caractérisation fonctionnelle des SEVPatient et des ExoDS.....	146
B. Caractéristiques fonctionnelle et phénotypique des DC générées en présence des ExoDS et SEVPatient	147
i. Propriétés régulatrices des DC générées avec les ExoDS et SEVPatient	147
ii. Étude du phénotype des DC générées avec les ExoDS et SEVPatient	149
iii. Propriétés immunorégulatrices des DCExoDS et DCSEVPatient <i>via</i> le sécrétome	151
Partie IV : Effet de la Galectine-9 dans la maturation des moDC	155
A. Effet immunosuppresseur de la Galectine-9 sur les PBMC	155
B. Caractéristiques fonctionnelles, phénotypiques des moDC générées en présence de Gal-9 et/ou d'anticorps bloquant	156
i. Étude du phénotype des DC générées avec la Galectine-9 ou de son anticorps bloquant.....	157
ii. Effet de la Gal-9 la sécrétion de cytokines par les moDC.....	158
iii. Effet de la Gal-9 sur les propriétés activatrices des moDC sur les LT	159
CONCLUSION GENERALE	163

Figure 47 : Nouveau modèle d'établissement des mregDC et de leurs caractéristiques en présence des ExoCNP	165
DISCUSSION.....	166
Les exosomes tumoraux de CNP jouent un rôle sur le développement des cellules dendritiques humaines en induisant la génération de mregDC.....	167
Les DCExoC15 produisent de l'IL-10 et ont une enzyme IDO active lors de la phase de différenciation.....	169
L'IL-4 joue un rôle dans la production d'IL-12 et d'IDO par les moDC après la maturation.....	170
IL4I1, un relais possible, remplaçant IDO dans la régulation induite par les moDC après la maturation ?	171
Les exosomes de CNP induisent une modification métabolique des DC.....	172
Les exosomes tumoraux de CNP exercent une attraction sur les mregDC.....	173
Les exosomes de CNP et les chimiokines CCL19 et CCL20 n'induisent pas la migration des tDC générées <i>in vitro</i>	174
La galectine-9 semble jouer un rôle au cours de la maturation des moDC	175
PERSPECTIVES	178
Utilisation d'autres lignées de CNP et utilisation d'exosomes dérivés d'un plus grand nombre de patients atteints d'un CNP à différents grades	178
Par quelle voie les exosomes de CNP induisent-ils les mregDCExoCNP ?	178
Dans quelle mesure la Galectine-9 est-elle impliquée dans les mécanismes d'action des exosomes de CNP ?.....	179
L'oncogène majeur d'EBV, LMP1, est-il impliqué dans les mécanismes d'action des exosomes de CNP ?.....	179
Des miARN spécifiques sont-ils transportés par les exosomes et responsables de leur effet immunosuppresseurs ?	181
L'Immune checkpoint LILRB4, présent sur les DCExoC15, peut-il constituer une cible en immunothérapie ?	181
Les DCExoCNP induisent-elles la génération de Treg et si oui des Treg de quel type ?	182
L'enzyme IDO est-elle impliquée dans la régulation des LT par les DC ?	182
Quelles perspectives pour la chimioattraction des DC ou des monocytes ?.....	183
Comment valider notre hypothèse et nos résultats dans un modèle <i>in vivo</i> murin de CNP ?.....	183
Les modifications du métabolisme des DCExoCNP sont-elles impliquées dans leur fonction régulatrice ?	184

Quel est l'impact de la thérapie photodynamique sur les exosomes de CNP et les DC ?	184
BIBLIOGRAPHIE	187
Annexe 1 : Représentation de la migration des moDC lors des expériences de chimioattraction.	237
Liste des communications orales	238
Liste des communications écrites	238
Grants	238
Liste des publications	239
Nasopharyngeal Carcinoma Exosomes Favor the Emergence IL-4 secreting mature regulatory Dendritic Cells	240
Modulatory effect of rapamycin and tacrolimus on monocyte-derived dendritic cells phenotype and function	244
Novel Therapies Boosting T Cell Immunity in Epstein Barr Virus-Associated Nasopharyngeal Carcinoma	246
Mini Review: Exosomes from discovery to Isolation	248
Abstract of the thesis	249
Résumé	Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures

Figure 1 : Biogenèse des vésicules extracellulaires (exosomes)

Figure 2 : Différentes voies de biogenèse des exosomes

Figure 3 : Mécanismes d'internalisation des vésicules extracellulaires (exosomes) par les cellules cibles

Figure 4 : Répartition mondiale des cas de carcinome du nasopharynx en 2020

Figure 5 : Facteurs associés à un risque de développement de CNP

Figure 6 : Image au microscope électronique du virus d'Epstein-Barr

Figure 7 : Structure du virus d'Epstein-Barr

Figure 8 : Représentation schématique du génome linéaire d'EBV.

Figure 9 : Modèle d'infection latente par le virus d'Epstein-Barr permettant une persistance virale dans l'hôte

Figure 10 : Reconnaissance et réponse immunitaire innée contre EBV

Figure 11 : Modèle de la tumorigénèse du carcinome du nasopharynx

Figure 12 : Microenvironnement tumoral du carcinome du nasopharynx

Figure 13 : Représentation de l'ontogénie des DC

Figure 14 : Schéma de la synapse immunologique

Figure 15 : Polarisation des LT CD4⁺ après activation par les DC

Figure 16 : Caractéristiques générales des cellules dendritiques tolérogènes

Figure 17 : Représentation des grandes voies métaboliques

Figure 18 : Variation du métabolisme des cellules dendritiques au cours de leur développement et activation

Figure 19 : Protocole d'obtention des exosomes de CNP et suivi de la prise tumorale des souris

Figure 20 : Caractérisation des exosomes de la lignée C15 de CNP

Figure 21 : Propriété immunosuppressive des exosomes C15 de CNP

Figure 22 : Protocole expérimental d'obtention des moDC à partir des monocytes humains

Figure 23 : Fonction suppressive des DC générées avec les exosomes C15 de CNP

Figure 24 : Caractérisation phénotypique des moDC après la différenciation par cytométrie en flux

Figure 25 : Caractérisation phénotypique des moDC après la maturation

Figure 26 : Expression de gènes associés à la voie d'activation ou de régulation dans les moDC

Figure 27 : Dosage des cytokines sécrétées par les moDC et étude de l'enzyme IDO après différenciation

Figure 28 : Dosage des cytokines secrétées par les moDC après la maturation

Figure 29 : Étude des enzymes IDO et IL4I1 après maturation des moDC

Figure 30 : Caractérisation de la fonction mitochondriale des moDC

Figure 31 : Analyse de l'activité glycolytique des moDC

Figure 32 : Effet chimioattracteur des ExoC15 et étude de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCL19 et CCL20 (CCR7 et CCR6)

Figure 33 : Schéma représentatif du protocole expérimental d'étude de la chimioattraction des moDC

Figure 34 : Migration *in vitro* des mDC, des tDC et des DCExoC15 par vidéo-microscopie

Figure 35 : Analyse quantitative du comportement migratoire illustré dans la Figure 34

Figure 36 : Caractérisation des exosomes de donneurs sains et de patients atteint de CNP

Figure 37 : Test de prolifération des PBMC en présence ou non des ExoDS ou SEVPatient

Figure 38 : Test de prolifération des LT CD3⁺ en présences de moDC

Figure 39 : Caractérisation phénotypique des moDC après maturation

Figure 40 : Dosage des cytokines secrétées par les moDC et étude des métabolites d'IDO après différenciation

Figure 41 : Dosage des cytokines secrétées par les moDC et étude des métabolites d'IDO après maturation

Figure 42 : Fonction suppressive et blocage de l'isoforme S de la Galectine-9

Figure 43 : Caractérisation phénotypique des moDC après différenciation

Figure 44 : Caractérisation phénotypique des moDC après maturation

Figure 45 : Dosage des cytokines secrétées par les moDC après la maturation

Figure 46 : Test de prolifération des LT CD3⁺ en présences de moDC

Figure 47 : Nouveau modèle d'établissement des mregDC et de leurs caractéristiques en présence des ExoCNP

Liste des tableaux

Tableau 1 : 8ème édition du système de classification UICC/AJCC pour le CNP

Tableau 2 : Profil de latence d'EBV et pathologies malignes associées

Tableau 3 : Essais cliniques terminés ou en cours sur les immunothérapies dans le CNP

Tableau 4 : Tableau des anticorps utilisés dans les différentes expériences

Tableau 5 : Gènes et séquences nucléotidiques correspondantes (sens et anti-sens) utilisées pour la RT-qPCR

Tableau 6 : Caractéristiques concernant la production des EVs

Tableau 7 : Regroupement des patients CNP en fonction de leur stade (classification TNM), des traitements et du statut EBV

Tableau 8 : Expression des molécules membranaires de population, de costimulation ou de présentation antigénique dans les monocytes et les moDC après la différenciation

Tableau 9 : Expression des molécules membranaires de population, de costimulation ou de présentation antigénique dans les moDC après maturation

Liste des abréviations

ADCC : cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendant

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AEP : asparagine endopeptidase

Ag : Antigène

AHR : Aryl-hydrocarbure

ALIX : ALG2 interacting protein X

ALPD : B cell lymphoproliferative disorders

APC : Cellules présentatrice d'antigène

APMK : 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase

ARF6 : ADP ribosylation factor 6

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine-Triphosphate

BART : BamH I-A region rightward transcript

BATF2 : Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 2

BHRF1 : BamH I fragment H rightward open reading frame 1

BL : Lymphome de Burkitt

BTK : Bruton's tyrosine kinase

BTLA : B and T-lymphocyte attenuator

CAF : Fibroblaste associé au cancer

CCL : Chimiokine Ligand

CCND1 : Cycline D1

CCR : Chimiokine de type C

cDC : DC conventionnelle

cDC1 : cDC de type 1

cDC2 : cDC de type 2

CDKN2A/B : Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A/B

CDP : Précurseur de DC

circARN : ARN circulant

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CLPTM1L/TERT

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNP : Carcinome du Nasopharynx

COM : Centre de masse

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CRD : Domaines de Reconnaissance aux Carbohydrates

CREBBP : cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein

CSF-1 : Colony-simulating factor 1

CTAR-1/2/3 : C-Terminal Activated Region 1/2/3

CTLA-4 : Cytotoxic lymphocyte associated protein 4

CTSB : cathepsine B

CXCL : Chimiokine (à motif C-X-C) ligand

CycloB : Cyclophiline B

CYPA : Cyclophiline A

DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns

DC : Cellule Dendritique

DCExoDS : moDC générée avec les ExoDS

DCSEVPatient: moDC générée avec les SEVPatient

DDX53 : Dead box helicase 53

DS : Dyad Symmetry

Dx : Déxaméthasone

EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

EBER : EBV Encoded RNA

EBNA1 : EBV-encoded Nuclear Antigen 1 (EBNA1)

EBV : Epstein-Barr Virus

EBV-VCA-IgA : Immunoglobuline A de la capsid d'EBV

ECAR : Taux d'acidification extracellulaire

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMT : Epithélio-mésenchymateuse

ENPG : Nasopharyngectomie endoscopique

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ERK-MAPK : Extracellular signal-regulated kinases/mitogen-activated protein kinases

ESCRT : Endosomal sorting complex required for transport

EV : Vésicule extracellulaire

ExoDS : Exosomes de donneur sain

ExoC15 : Exosomes de la lignée C15 de CNP

SEVPatient: Exosomes de patient CNP

FAO : Oxydation des acides gras

FFCP : carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone

Flt3L : fms-like tyrosine kinase 3 ligand

FMI : Indice de migration

FR : Family of Repeats

Gal-9 : Galectine-9

Gal-9S : Isoforme S de la Gal-9

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GILT : gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase

GM-CSF : Granulocyte/macrophage colony stimulating factor

HCC : Hépatocarcinome

HHV-4 : Herpesvirus Humain de type 4

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1 α

HLA : Human Leukocyte Antigen

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HPRT : Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transférase

HSC : Cellule souche hématopoïétique

HSP90 / 70: Heat shock protein 90 / 70

HSPG : Protéoglycane héparane sulfate

IAA : Indole-acétique acide

IBL : Institut de Biologie de Lille

iDC : Cellule dendritique immature

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN : Interféron

IFN-(α , β , γ) : Interféron-(α , β , γ)

IL : Interleukine

IL4I1 : Interleukin-4-induced gene 1

ILA : Indole-lactique acide

IMRT : Radiothérapie avec modulation d'intensité

INOS : inducible Nitric Oxide Synthase

IncARN : ARN non codant

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IR : Région interne répétée

ISEV : International Society for Extracellular Vesicles

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif

iTreg : Treg induit

IVL : Vésicule intraluminale

I3P : Idole-3-acide pyruvique

Kyn : Kynurénine

KynA : Acide kynurénique

LAG-3 : Lymphocyte Activation Gene-3

LB : Lymphocyte B

LH : lymphome de Hodgkin

LMP1 : Latent membrane protein 1

LMP2 : Latent membrane protein 2

EBER : EBV Encoded RNAs

LNH : Lymphome non-Hodgkinien

LP : Précurseur lymphoïde

LT : lymphocytes T

LTC : LT cytotoxiques

MCP-1 : Monocytes chemoattractant protein-1

M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor

MDP : précurseurs dérivés myéloïdes

MDSC : cellules suppressives dérivés myéloïdes

MECOM : MDS1 and EVI1 Complex Locus

MFI : Médiane d'intensité de fluorescence

MI : Mononucléose Infectieuse

miARNs : microARN

MICB : MHC Class I Polypeptide-Related Sequence B

MLR : Mixed Leukocytes Reaction

MMP9 : Matrice Métalloprotéase 9

mo-DC : DC dérivée de monocyte

MP : Précurseur myéloïde

mregDC : Cellule dendritique mature régulatrice

MST1R : Macrophage stimulating 1 receptor

mTOR : serine/threonine kinase mammalian target of rapamycine

MVB : Corps multivésiculaire

MVE : Endosome multivésiculaire

NCCN : National Comprehensive Cancer Network

NF- κ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NFATC1 : Nuclear Factor of Activated Cells 1

NK : natural killer

NKG2D : NK group 2 member D

NLR : NOD-Like Receptor

NOS2 : Oxyde nitrique synthase 2

nTreg : Treg naturel

OCR : Taux de consommation d'oxygène

OMS : Organisation mondiale de la santé

OriLyt : origine de répliation lytique

OXPPOS : Phosphorylation Oxydative

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PAX5 : Paired Box Protein 5

PD-1 : Programmed cell death protein 1

pDC : DC plasmacytoïde

PDT : Thérapie photodynamique

PGC1 α : PPAR γ co-activator 1 α

PI3K/MAPK : Phosphatidylinositol 3-Kinase / Mitogen-Activated Protein Kinase
PLD2 : Phospholipase D2
PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ
Pré-cDC : pré-DC conventionnelle
PRR : Pattern Recognition Receptor
RIG-I : Retinoic acidinducible gene I
RLR : RIG-I-Like Receptor
RT : Température ambiante
Rta : BRFL1
SEV : Small EV
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide sensitive facto (NSF) attachement protein receptor complex
SRC : Capacité respiratoire mitochondriale
SSP1 : Small Secreted Protein-1
TAM : Macrophage associé à la tumeur
TCA : Tricarboxylic Acid cycle
tDC : Cellule dendritique tolérogène
TIGIT : T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIL : Lymphocyte infiltrant la tumeur
TIM : Cellule myéloïde infiltrant la tumeur
TIM-3 : T cell immunoglobulin and Mucin domain 3
TLR : Toll-like Receptor
TME : Microenvironnement tumoral

TNFR : Tumor necrosis factor receptor
TNFRS19 : TNF receptor superfamily member 19
TNM : Tumeur – Nodules – Métastases
TPO : thrombopoïétine
TR : Région terminale
TRADD : TNF Receptor type I Associated Death Domains
TRAFs : TNF Associated Factors
Treg : Lymphocytes T régulateur
Trp : Tryptophane
TRPS : Tunable Resistive Pulse Sensing
TSG-101 : Tumor susceptibility gene 101
UICC/AJCC : Union internationale contre le cancer et du Comité mixte américain sur le cancer
uPA : urokinase plasminogen activator
UPR : Unfolded protein response
VTA-1 : Vesicle Trafficking 1
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VPS32 : Vacuolar protein sorting-associated protein 32
ZEBRA : BamHI Z fragment Epstein-Barr virus Replication Activator
2-DG : 2-déoxyglucose
5-FU : Fluorouracil

Préambule

Chers lecteurs,

Ces travaux s'intéressent aux effets des exosomes de carcinome du nasopharynx sur la maturation des cellules dendritiques humaines.

Ce manuscrit est organisé autour de 4 parties principales, une introduction, une partie matériels et méthodes, une explication des résultats obtenus ainsi qu'une partie conclusion, discussion/perspectives autour des différents résultats.

L'introduction aborde les différents acteurs majeurs de ce sujet de thèse à savoir les exosomes, le carcinome du nasopharynx et son lien avec le virus d'Epstein-Barr ainsi que les cellules dendritiques. Pour chacune de ces parties, sont décrits à la fois les aspects biologiques et les implications dans le cancer des différents éléments ; elles peuvent être lues de manière indépendante.

La partie matériels et méthodes, qui suit le descriptif de mes objectifs, décrits toutes les expériences que nous avons effectuées au cours de ces travaux de thèse.

Ensuite, sont présentés les résultats obtenus durant cette thèse. Tout d'abord la partie abordant les effets des exosomes de CNP sur la fonction et le phénotype des cellules dendritiques humaines constituant la partie principale de ces travaux. Puis, est présentée une étude de l'effet chimioattracteur de ces exosomes sur les cellules dendritiques humaines. Dans une troisième partie, sont mis en parallèle des travaux menés à partir de vésicules extracellulaires de patients atteints d'un CNP sur cellules dendritiques humaines. La dernière partie des résultats est consacrée à l'étude d'une voie moléculaire pouvant être impliquée dans les effets des exosomes que nous décrivons dans la première partie des résultats.

Enfin, nous concluons les résultats autour d'un schéma et nous discutons les différents aspects avant de terminer sur plusieurs perspectives d'étude.

Je vous en souhaite une bonne lecture.

Introduction

INTRODUCTION

I- Exosomes

Toutes les cellules sont capables de sécréter différents types de vésicules membranaires connues sous le nom de vésicules extracellulaires (EVs) dont les exosomes font partis. Initialement, ces EVs étaient décrites comme moyens d'évacuer de la cellule tous les éléments et molécules inutiles (Johnstone *et al.*, 1987). Actuellement, on sait qu'elles occupent des fonctions importantes notamment dans la communication cellulaire, le transfert de matériel biologique entre cellules (ADN, ARN, protéines...) et dans la régulation de la réponse immunitaire (Colombo, Raposo and Théry, 2014; Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Le terme EVs regroupe un ensemble très hétérogène de vésicules membranaires de tailles variables entre 20 nm à 5 µm. Parmi ces EVs, on retrouve les microvésicules (50 à 1000 nm), les corps apoptotiques (50 à 500 nm) et les exosomes (20 à 150 nm) (Théry, Ostrowski and Segura, 2009; van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018). Au-delà de la taille, les EVs se distinguent par leur biogenèse : les exosomes viennent d'une biogenèse endosomale tandis que les microvésicules proviennent d'un bourgeonnement de la membrane plasmique. Dans les années 1990, les exosomes étaient connus pour être sécrétés par les LB et les DC (Raposo *et al.*, 1996; Zitvogel *et al.*, 1998) ayant donc un rôle potentiel dans la réponse immunitaire. Maintenant, il est bien connu que beaucoup d'autres types cellulaires notamment les cellules cancéreuses et d'autres populations immunitaires sécrètent des exosomes. En fonction des cellules d'origines plusieurs dénominations apparaissent, on retrouve les dexosomes, les prostasomes ou les tolérosomes qui correspondent respectivement aux exosomes produits par des cellules dendritiques, de la prostate et des cellules épithéliales intestinales (van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018).

A. Biogenèse

Les exosomes proviennent de la voie de biogenèse endosomale. Ils sont générés dans la lumière des endosomes multivésiculaires (MVEs) suite à un bourgeonnement de la membrane pendant leur maturation donnant des corps multivésiculaires (MVBs) contenant les précurseurs des exosomes (Raposo and Stoorvogel, 2013). Les MVBs ont ensuite deux avenir possibles. Ils peuvent soit fusionner avec le lysosome formant un endolysosome menant à la dégradation du contenu des MVBs, soit ils fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule libérant leur contenu vésiculaire (exosomes) dans le milieu extracellulaire (**Figure 1**).

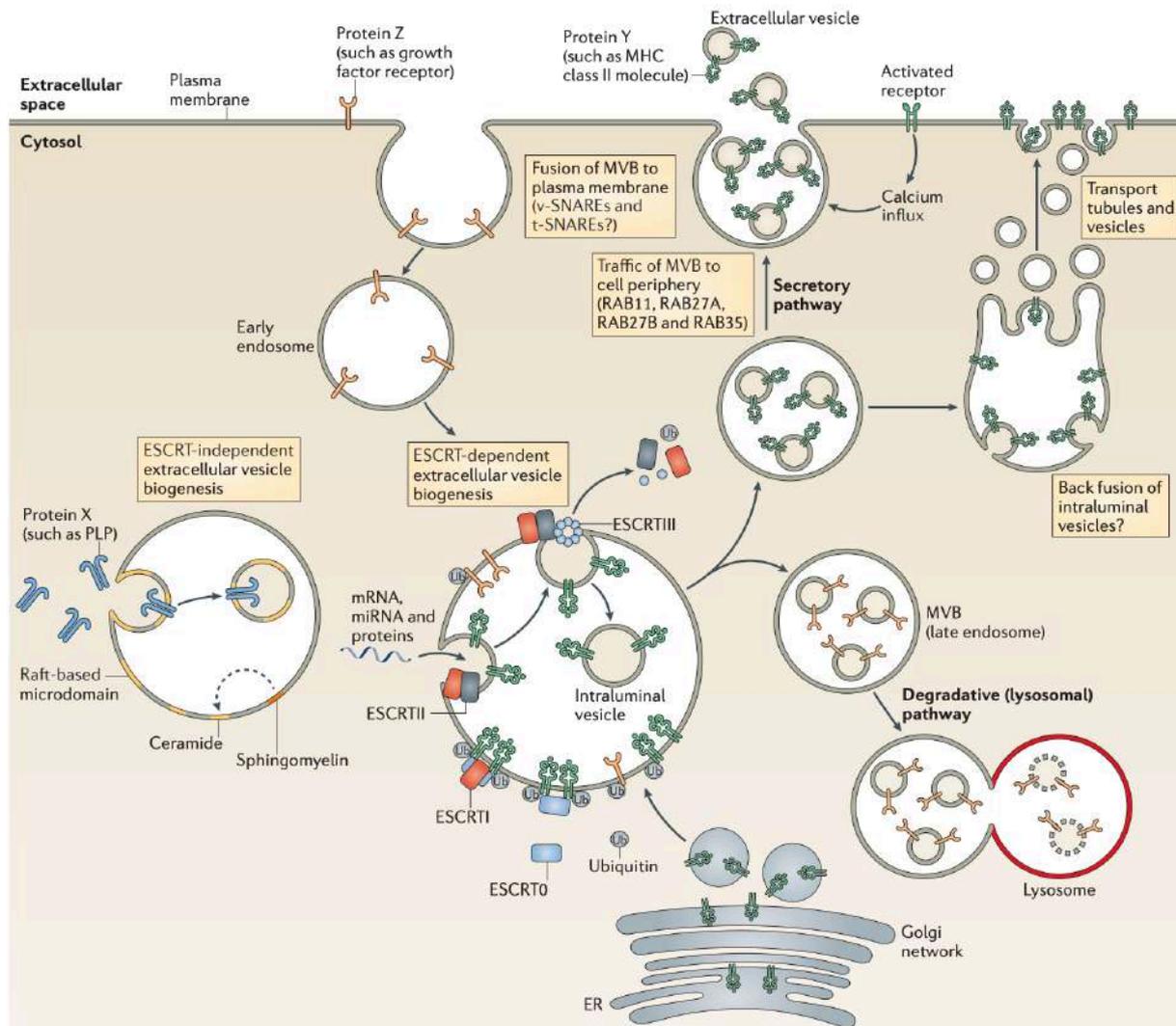


Figure 1 : Biogenèse des vésicules extracellulaires (exosomes) d'après (Robbins and Morelli, 2014). Les exosomes sont générés sous la forme de vésicules intraluminales (IVL) dans les MVB *via* les voies dépendantes et indépendantes ESCRT. Les protéines transportées depuis le Golgi ou internalisées depuis la membrane cellulaire, sont ubiquitinylées sur leurs domaines cytosoliques. Le complexe ESCRT-0 reconnaît les protéines ubiquitinylées présentes sur la membrane des endosomes, puis répartit les protéines en microdomaines et se lie au complexe ESCRT-I qui recrute la sous-unité ESCRT-II. ESCRT-I et II initient le bourgeonnement de la membrane des MVB formant les IVL. Durant le bourgeonnement, les différents ARN et protéines cytosoliques ont accès à la vésicule en formation. Ensuite ESCRT-II recrute ESCRT-III entraînant le clivage des IVL en vésicules libres au sein des MVB. Les molécules d'ubiquitine libres et les sous-unités ESCRT sont libérées dans le cytosol pour être recyclées. D'autres protéines sont triées dans les IVL de façon indépendante de la voie ESCRT, mais *via* des microdomaines riches en sphingolipides, à partir desquels les sphingomyélinases forment des céramides. La céramide induit la fusion des microdomaines et déclenche la formation de l'IVL. Les MVB vont ensuite dans la voie de sécrétion ou de dégradation. Dans la voie de sécrétion, les MVB circulent vers la périphérie de la cellule pour fusionner avec la membrane cellulaire libérant les IVL appelées exosomes. Dans la voie de dégradation, les MVB fusionnent avec les lysosomes permettant notamment le recyclage des récepteurs membranaires ou la régulation des voies de signalisation.

Différents mécanismes ont été décrits dans la formation et la production des exosomes (**Figure 2**). Le mécanisme principal fait intervenir une machinerie dépendante des complexes ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). Ce dernier agit de manière progressive avec les sous-unités ESCRT-0 et ESCRT-I qui regroupent des cargos transmembranaires ubiquitinylés sur des microdomaines limitant les MVEs. Ensuite, la sous-unité ESCRT-II recrute ESCRT-III qui induit l'endocytose de la membrane du MVEs et la fission de la membrane formant des vésicules intraluminales (IVLs) précurseurs des exosomes. De plus, les protéines du complexe ESCRT fonctionnent en synergie avec d'autres protéines comme VTA-1 (Vesicle Trafficking 1), ALIX (ALG2 interacting protein X), VPS32 (vacuolar protein sorting-associated protein 32) dans les étapes de formation des exosomes (Colombo *et al.*, 2013). Par ailleurs, les exosomes peuvent être produits par une voie indépendante de la voie ESCRT (**Figure 2**) (van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018). Cette voie indépendante de ESCRT est contrôlée par l'intervention de certains lipides comme les sphingolipides céramides, de la GTPase ARF6 (ADP ribosylation factor 6) et l'effecteur de la phospholipase D2 (PLD2) (Azmi, Bao and Sarkar, 2013). Dans cette voie indépendante des complexes ESCRT, les tétraspanines (CD63, CD81, CD82 ou CD9) jouent également un rôle notamment dans le chargement des cargos dans les exosomes. Elles participent à la formation d'amas et de plateformes membranaires avec d'autres tétraspanines qui formeront des microdomaines destinés à bourgeonner et former les IVLs.

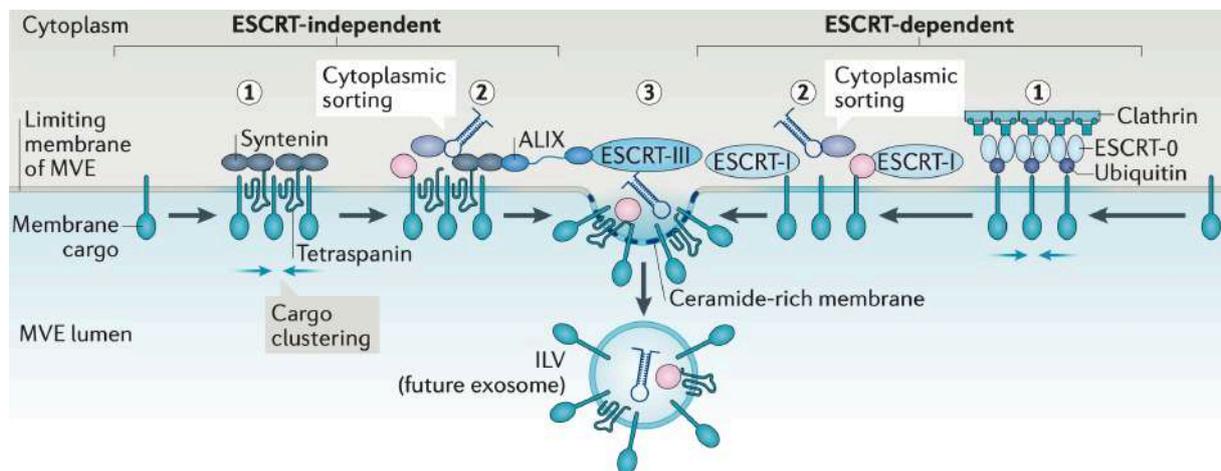


Figure 2 : Différentes voies de biogenèse des exosomes (van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans les étapes de formations des exosomes. Tout d'abord les lipides et les protéines membranaires se regroupent en microdomaines à la surface des MVB. La formation de ces microdomaines favorise le bourgeonnement de la membrane des MVB et la fission formant des ILV dans la lumière des MVB. Les mécanismes de biogenèse des exosomes impliquent les sous-unités du complexe ESCRT mais également des mécanismes indépendants de la voie ESCRT faisant intervenir notamment les tétraspanines ainsi que les synténines.

Une fois les exosomes formés, l'adressage à la membrane des MVBs et la sécrétion des exosomes est régulée par différents facteurs. Les complexes solubles SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein receptor complex) et le pH du microenvironnement vont réguler la fusion des MVBs avec la membrane plasmique et ainsi indirectement la libération des exosomes (Fader *et al.*, 2009; Parolini *et al.*, 2009; Zylbersztejn and Galli, 2011). La sécrétion des exosomes fait également intervenir les protéines de la famille RAB telles que RAB27A, RAB27B, RAB11, RAB 35 et RAB7 (C. Hsu *et al.*, 2010; Ostrowski *et al.*, 2010).

Une fois sécrétées dans l'espace extracellulaire, les exosomes vont pouvoir interagir avec les cellules cibles pour libérer leur contenu provoquant des changements phénotypiques et/ou fonctionnels affectant leur physiologie et leur développement. Pour cela, différents mécanismes ont pu être décrits. Les exosomes peuvent être internalisés par interaction récepteur/ligand, par endocytose ou bien par fusion avec la membrane de la cellule. Ce processus est résumé dans la **Figure 3**. En fonction du type cellulaire, les exosomes peuvent se lier à un récepteur présent à la membrane plasmique et ainsi induire des voies de signalisation intracellulaire comme la présentation antigénique par exemple. Les exosomes peuvent également être internalisés par différents mécanismes (macropinocytose, phagocytose, endocytose). Une fois internalisé, ils pourront se retrouver dans les endosomes précoces puis dans les MVEs où ils se mélangent avec les ILVs venant de la voie endosomale de la cellule. Ensuite le MVEs peut libérer son contenu hors de la cellule ou fusionner avec un lysosome dégradant le contenu du MVEs servant par la suite pour le métabolisme cellulaire. Enfin, les exosomes au niveau de la membrane plasmique ou dans les MVEs peuvent libérer leur contenu dans le cytoplasme de la cellule par fusion membranaire permettant notamment le relargage de microARN. L'internalisation des exosomes par la cellule cible n'est pas encore bien connue. Ces processus sont complexes et dépendent à la fois de l'origine des exosomes, de l'origine de la cellule cible ainsi que des protéines présentes à la surface des exosomes et des cellules (Mulcahy, Pink and Carter, 2014). Cette internalisation fait intervenir des molécules d'adhésion présentes à la surface des exosomes comme les tétraspanines, les glycoprotéines, les intégrines permettant à la cellule d'internaliser ou non le contenu vésiculaire (Nazarenko *et al.*, 2010; Rana *et al.*, 2012). Dans le cas d'EVs dérivés de cellules B infectées par EBV en latence I ou III, Asuka et ses collaborateurs ont rapporté que l'internalisation des EVs se fait par une endocytose dépendante des cavéoles (Nanbo *et al.*, 2013).

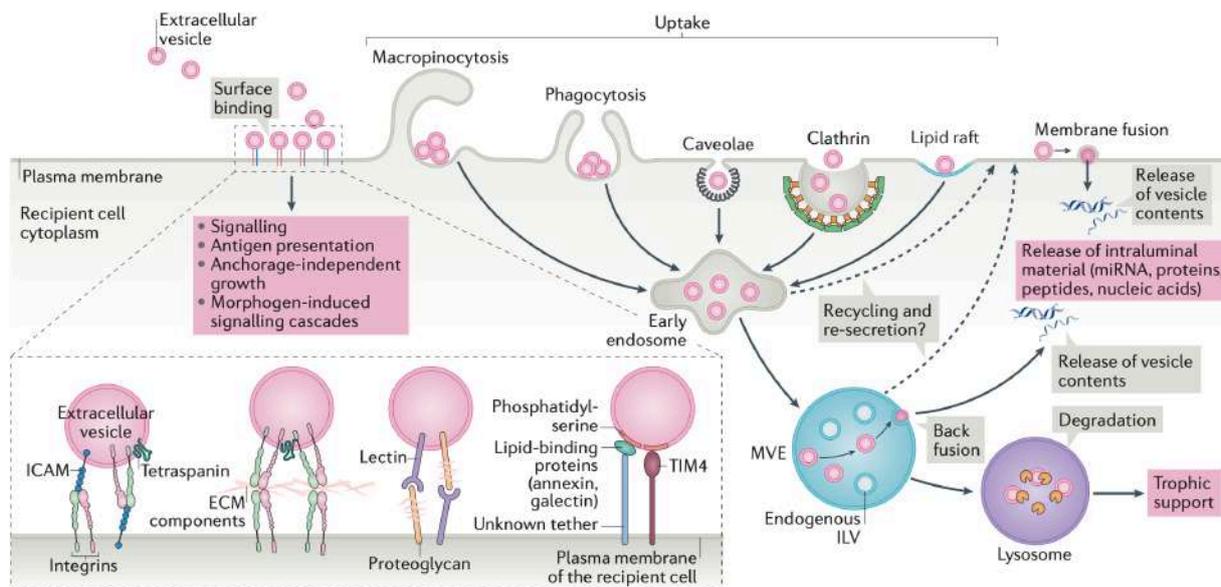


Figure 3 : Mécanismes d'internalisation des vésicules extracellulaires (exosomes) par les cellules cibles d'après (van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018). Dans la cellule cible, les exosomes vont pouvoir se lier à la surface cellulaire et peuvent subir différentes choses. En fonction du type cellulaire, les exosomes peuvent rester lier à la surface membranaire, par exemple au niveau des intégrines et initier des voies de signalisation intracellulaires comme la présentation antigénique. D'autres part, les exosomes peuvent être pris en charge par différents moyens. L'internalisation conduit les exosomes vers la voie endosomale canonique, où ils atteignent les MVE et seront ensuite susceptible de se mélanger aux IVL présent dans les MVB de la cellules cible. La fusion des MVE avec le lysosome entraîne la dégradation des vésicules extracellulaires et le recyclage de leur contenu pour alimenter le métabolisme de la cellule concernée. Les exosomes présents à la membrane plasmique ou à la membrane des MVE peuvent libérer leur contenu intraluminal dans le cytoplasme de la cellule réceptrice par fusion. Ce mécanisme est encore mal compris mais est indispensable pour le transfert de miARNs.

B. Marqueurs caractéristiques et composition

Les exosomes peuvent transférer différents types de molécules incluant des ADN, des ARN et microARN, des lipides, des métabolites ainsi que des protéines (Liang *et al.*, 2021). Le contenu des exosomes dépend grandement de la cellule d'origine et est très conservé entre les différentes cellules. En effet, nous retrouvons une majorité de protéines qui sont impliquées dans la biogenèse des vésicules. Ainsi, nous trouvons les protéines de la voie dépendante d'ESCRT ainsi que d'autres protéines comme ALIX et TSG-101 (tumor susceptibility gene 101), HSP70 et HSP90 (heat shock proteins) ainsi que les protéines de la voie indépendante d'ESCRT telles que les tétraspanines CD63, CD81 et CD9. On retrouve également les protéines intervenant dans la sécrétion des exosomes comme les protéines RAB. D'autres molécules comme les molécules du CMH I et II, des molécules du cytosquelette (tubuline, actine), des protéines d'adhésion ICAM, des intégrines sont généralement présentes sur les exosomes. Les exosomes comportent également toutes sorte d'acides nucléiques dont les ARNm, des

microARN, des ADN mitochondriaux, et autres longs ARN non codants (lncARNs). Tous ces acides nucléiques impacteront la synthèse protéique dans les cellules cibles. Enfin, les exosomes sont composés de différents lipides dont le cholestérol, phospholipides, phosphatidyléthanolamines, diglycérides et polyglycérols. Ces lipides sont impliqués notamment dans le maintien de la morphologie des exosomes ainsi que dans des processus biologiques dans les cellules réceptrices. Ils peuvent par exemple servir de médiateurs de la signalisation en interagissant avec les prostaglandines ou les phospholipase C et D (Subra *et al.*, 2010). A ce jour la base de données ExoCarta (<http://www.exocarta.org>) a collectée 9 769 protéines, 3 408 ARNm, 2 838 microARN et 1 116 lipides qui ont été identifiées dans des exosomes de différents types cellulaires.

Toutes les protéines intervenant dans la biogenèse des exosomes comme les tétraspanines CD63, CD81, CD9 ont longtemps été considérées comme marqueurs spécifiques des exosomes, mais sont également retrouvées sur les autres EVs dont les microvésicules. En ce sens, les protéines ALIX et TSG-101 ont été proposées comme marqueurs plus spécifiques de la voie endosomal et donc des exosomes. Cependant ces protéines sont également retrouvées sur les autres EVs. A ce jour, il n'y a pas de réels marqueurs spécifiques des exosomes. Néanmoins, la caractérisation des marqueurs membranaires comme les tétraspanines et les marqueurs de la voie de biogenèse couplée à une caractérisation de la taille des vésicules restent une bonne méthode pour identifier les exosomes. En ce sens l'ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) préconise l'utilisation du terme « Small EVs (SEVs) » à la place d'exosome (Théry *et al.*, 2018) bien que le terme exosome soit encore très utilisé dans les publications.

Au cours de ma thèse, je me suis plus spécifiquement intéressé à l'immuno-modulation des exosomes tumoraux de carcinome du nasopharynx (CNP). Ainsi, dans les parties suivantes, je développerai l'utilisation des exosomes comme outil thérapeutique à la fois dans le diagnostic et le pronostic, mais également comme cible dans les traitements. Enfin, je terminerai en abordant l'impact des exosomes tumoraux au cours de la carcinogenèse du CNP et leur rôle dans l'échappement à la réponse immunitaire favorisant le développement tumoral.

C. Les exosomes comme outils thérapeutiques

i. Les exosomes comme biomarqueurs diagnostics et pronostics

Les exosomes tumoraux sont impliqués dans divers mécanismes impactant le développement tumoral et notamment dans la communication intercellulaire faisant d'eux une cible intéressante pour d'éventuels biomarqueurs ou traitements anti-cancéreux. Du fait de leur structure lipidique, les exosomes sont très stables dans le temps et sont retrouvés dans les différents fluides biologiques comme les urines, la salive, les fluides cérébrospinaux, le sérum justifiant ainsi de leur utilisation comme biomarqueurs dans les biopsies liquides non-invasives (Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012; Vlassov *et al.*, 2012). C'est leur capacité à transporter différentes protéines, ADN, ARN ou miARNs reflétant l'état de la cellule d'origine qui fait des exosomes un outil d'intérêt pour le diagnostic ou la prédiction de réponses aux traitements dans différents cancers. En ce sens, les protéines, acides nucléiques portés par les exosomes ont été proposés comme nouveaux biomarqueurs diagnostics et pronostics dans différents cancers (Bellassai *et al.*, 2019). Par exemple, dans l'hépatocarcinome (HCC), le miR-21 présent dans les exosomes sérique est plus élevé chez les patients atteints de HCC que chez les personnes saines et pourrait servir comme potentiel marqueur diagnostique du HCC (Karimzadeh *et al.*, 2020). De plus le miR-21 peut être utilisé comme biomarqueur dans d'autres cancers comme le cancer de l'estomac, de la thyroïde, du foie, du colon ou même du pancréas (Kim *et al.*, 2018; Yan, Fu and Ming, 2018; Mannavola *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2020). Ainsi, les miARNs, les long ARNs non codants (lncARNs), les ARNs circulants (circARNs) ainsi que les protéines exosomales peuvent servir de biomarqueurs dans différents cancers (Zhou *et al.*, 2021).

Dans le contexte du CNP, les miARNs circulants ont d'abord été décrits comme biomarqueurs pronostics ou diagnostics. Les miR-BART7 et miR-BART13 sont significativement plus élevés dans les plasmas de patients atteints de CNP et le niveau de miR-BART7 est associé au développement des métastases. De plus, une diminution de ces deux miARNs a été observé après radiothérapie faisant d'eux de potentiels biomarqueurs pour la réponse aux radiothérapies (G. Zhang *et al.*, 2015). De même, la détection du miR-BART17-5p ou du miR-BART7-3p circulant après traitement est un potentiel biomarqueur de mauvais pronostics (Hirai *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2020). Dans le CNP, le miR-BART1-5p corrèle avec la progression tumorale avec 93,5% de sensibilité et 100% de spécificité (X.-H. Zheng *et al.*, 2016). Bien que ces ARNs circulants constituent de bons biomarqueurs, ces derniers se retrouvent très rapidement dégradés dans la circulation pouvant limiter leur détection. Ainsi, la membrane lipidique des exosomes pourrait fournir une protection supplémentaire à ces ARNs

permettant une détection plus fiable. Différentes études ont relevé l'utilisation du contenu exosomal comme biomarqueur du CNP. Zheng et ses collaborateurs ont rapporté une augmentation du miR-1301-3p dans les exosomes plasmatiques des patients en stade précoce de CNP indiquant son application comme biomarqueurs diagnostiques des stades précoces (Zheng *et al.*, 2021). Zhaolei *et al.* ont suggéré l'utilisation de l'ARNm BATF2 comme pronostic dans le CNP. BATF2 est un gène suppresseur de tumeur décrit dans différentes tumeurs (cancer du poumon, de la prostate, HCC...) (Zhaolei *et al.*, 2021) et dans le CNP les taux sériques et exosomaux sont moins importants que chez des donneurs sains (Zhaolei *et al.*, 2021). Ils ont dans le même temps remarqué une augmentation de l'expression de BAFT2 suite à des traitements par radiothérapie et chimiothérapie suivie d'une baisse de cette expression chez les patients avec une rechute (Zhaolei *et al.*, 2021) pouvant permettre de prédire les récurrences ou les résistances aux traitements. Une autre étude menée par Luo et ses collaborateurs a montré qu'une augmentation d'ARN circulaire circMYC dans les exosomes corrèle avec la prolifération et la radiorésistance des CNP. CircMYC serait donc un biomarqueur possible pour la stratification des patients résistants aux radiothérapies (Luo *et al.*, 2020). De même, J *et al.* ont rapporté que le miR-106a-5p présent dans les exosomes de CNP participait à l'établissement des chimiorésistances au cisplatine (J *et al.*, 2021). L'utilisation de ce miR pourrait aider au développement d'un marqueur diagnostique pour le choix de traitement des CNP.

Enfin, des biomarqueurs déjà existants peuvent être couplés à l'utilisation des molécules exosomales pour rendre les résultats plus spécifiques. C'est notamment le cas pour la détection de la cyclophiline A (CYPA) combinée à l'anticorps contre l'immunoglobuline A de la capsid d'EBV (EBV-VCA-IgA) (Liu *et al.*, 2019). En effet, EBV-VCA-IgA est un biomarqueur pour le CNP, mais son association avec l'analyse de la protéine CYPA exosomale a montré une spécificité plus importante dans le diagnostic du CNP. De plus le niveau de CYPA dans les exosomes a été corrélé positivement avec le niveau de LMP1 dans les exosomes, faisant de CYPA une cible intéressante comme biomarqueur non invasif dans le diagnostic des CNP (Liu *et al.*, 2019).

ii. Les exosomes comme cibles ou véhicules de traitement

Outre leur utilisation comme biomarqueurs, les exosomes sont de bons candidats à la fois pour le transport de molécules de traitement, mais également comme cible directe de thérapies. La bicouche lipidique des exosomes ainsi que les récepteurs présents à la surface permettent de faciliter la délivrance de certaines molécules à des cellules cibles. Depuis

plusieurs années, des petites molécules comme le paclitaxel, la doxorubicine ou le curcumin ont été encapsulés au sein des exosomes pour des thérapies anticancéreuses (Sun *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014). En plus du chargement des exosomes avec des petites molécules, des études se sont intéressées sur le chargement avec des miARNs pouvant inhiber des voies de signalisation intervenant dans le développement tumoral. En ce sens, Ohno *et al.* ont montré que le transport du miARN let-7a par les exosomes dans un modèle *vivo* murin de xénogreffes de cancer du sein pouvait inhiber le développement tumoral (Ohno *et al.*, 2013). La capacité des exosomes à induire l'activation de certaines voies cellulaires font d'eux des outils thérapeutiques intéressants. Par exemple, il a été montré que le ciblage du transfert de la protéine LMP1 d'EBV et de l'expression du miR-203 était associé à des résultats positifs dans les CNP après traitement par l'aspirine (L. Zuo *et al.*, 2019). De plus, différentes molécules peuvent être incorporées dans les exosomes afin d'inhiber le fonctionnement de miARNs dans les cellules cibles. En ce sens, Wang et ses collaborateurs ont montré que les exosomes tagués iRGD ciblant les cellules de CNP exprimant les intégrines $\alpha V\beta 3$ et contenant des antagomir-BART10-5P et antagomir-18a possèdent de bons effets anti-angiogénique et diminuent la croissance du CNP à la fois *in vitro* et *in vivo* (Jianguo Wang *et al.*, 2020). L'utilisation d'exosomes dérivés de cellules souches mésenchymateuses pour délivrer le miR-34c (un suppresseur de tumeur dans le CNP) aux cellules tumorales permet de diminuer l'expression de la β -caténine diminuant l'invasion, les métastases la prolifération ainsi que l'EMT des cellules de CNP. Un autre domaine prometteur dans l'utilisation des exosomes comme outil thérapeutique est la vaccination anticancéreuse étant donné leur capacité à délivrer ou présenter des antigènes tumoraux activant la réponse T cytotoxiques. Néanmoins, dans le contexte du CNP cette approche n'a pas été testée spécifiquement dans le CNP (Xu *et al.*, 2020).

Les exosomes peuvent également faire l'objet de cibles de traitements thérapeutiques. Pour cela deux méthodes peuvent être envisagées, inhiber la production d'exosomes par les cellules tumorales et/ou bloquer l'internalisation des exosomes par les cellules (Lan *et al.*, 2019). L'inhibition de la production d'exosomes a été étudiée par plusieurs équipes. Guan et ses collaborateurs ont montré que des inhibiteurs des pompes à protons étaient capables d'inhiber la sécrétion d'exosomes par les cellules tumorales de cancer gastrique suggérant une possible utilité de ces inhibiteurs comme outils thérapeutiques (Fu *et al.*, 2019). Une autre molécule inhibitrice a montré son intérêt, GW4869 qui est décrit comme inhibant la sécrétion des exosomes par la lignée cellulaire 293T (Barger *et al.*, 2016) et qui permet la diminution du taux de survie des cellules de cancer pancréatique (Lan *et al.*, 2019). Un autre moyen d'inhiber la fonction des exosomes est d'entraver leur interaction/internalisation avec les cellules cibles.

En ce sens les protéoglycanes héparane sulfate (HSPGs), qui sont des récepteurs d'internalisation des exosomes dérivés de cancers, pourraient atténuer l'absorption des exosomes (Guo *et al.*, 2020). De plus dans le cancer du pancréas il a été montré que la lectine Reg3 se liant à la surface des exosomes et libérée par les tissus sains du pancréas peut inhiber l'absorption des exosomes libérés par les cellules tumorales freinant la progression tumorale et fournissant une stratégie intéressante pour contrer le rôle des exosomes (Qiu *et al.*, 2018). En revanche, cet effet dans le CNP n'a pas été documenté.

D. Exosomes tumoraux

Les exosomes dérivés de tumeurs sont impliqués dans le développement de différentes pathologies, dans la dissémination virale, dans les neuropathies mais également dans les multiples mécanismes nécessaires à la progression tumorale que nous allons aborder. Les cellules tumorales sécrètent dans le microenvironnement des exosomes appelés TEX (tumor exosomes) qui jouent un rôle durant toutes les phases de développement des tumeurs (C. Hu *et al.*, 2018).

Les TEX participent notamment à la progression tumorale. Dans le cancer colorectal, les exosomes contiennent des miARN interférant avec la phase M du cycle cellulaire favorisant la prolifération des cellules (Hong *et al.*, 2009). De plus, une des caractéristiques des tumeurs solides et la mise en place de l'angiogenèse permettant l'accès à des nutriments favorisant le développement tumoral. Une étude dans des cellules de gliomes a montré que les exosomes favorisent l'expression de facteurs proangiogéniques tels que TGF- β , le récepteur au TGF- β et le VEGF1 (Lang *et al.*, 2017). En effet, les TEX de cellules de gliomes contiennent des long ARN non codant (LncARN) dont le LncARN POU3F3 qui augmente l'expression de ces facteurs proangiogéniques. Il a même été observé que les exosomes de tumeurs hypoxiques portent le miR-210 qui permet la modulation de l'expression du VEGF responsable du recrutement des cellules endothéliales pour la mise en place de l'angiogenèse tumorale (Jung *et al.*, 2017).

Un lien entre exosomes et métastases a longtemps été suspecté. Le processus métastatique comprend plusieurs étapes. La première étape est l'invasion locale par les cellules cancéreuses qui ensuite passent dans la circulation *via* le système lymphatique ou les vaisseaux sanguins (intravasation). Une fois dans la circulation, les cellules vont se disséminer dans les différents organes, sortant de la circulation pour entrer dans le parenchyme des organes distants (extravasation). Enfin, les cellules tumorales dans leur nouvel environnement peuvent mourir,

rester en dormance ou se développer formant une métastase. Les exosomes ont un impact sur les différentes étapes menant aux métastases. Les TEX sont capables de moduler la matrice extracellulaire pour favoriser l'invasion et les métastases. Par exemple, les exosomes dérivés de la lignée cellulaire d'adénocarcinome pancréatique de rat recrutent des intégrines et des protéases, qui dégradent les fibres de collagènes et la fibronectine modifiant la structure de la matrice extracellulaire (Yue *et al.*, 2015). De plus, il a été montré que les exosomes de cancers du sein induisent la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) essentielle pour l'invasion et les métastases. De nombreux facteurs d'EMT délivrés par les exosomes tels que, HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α), la métalloprotéase matricielle 13 (MMP13) ou même la protéine LMP1 (latent membrane protéine 1) d'EBV ont contribué aux caractéristiques métastatiques des cellules ciblées par les exosomes (Zhang and Yu, 2019). Enfin, les TEX d'hépatocarcinome contiennent la chimiokine CXCR4 qui favorise la migration tumorale, l'invasion et l'angiogenèse lymphatique. Toutes ces étapes permettent la mise en place de la niche prémétastatique et ainsi l'implantation des futures tumeurs (Li *et al.*, 2018).

Les TEX ont un rôle primordial dans le maintien de la tumeur dans son microenvironnement. En effet, l'implication des exosomes dans l'échappement des tumeurs au système immunitaire a longtemps été étudié et est très largement accepté aujourd'hui (Hao *et al.*, 2022). Notamment, les TEX exprimant des antigènes tumoraux peuvent inhiber l'activation des cellules T et induire leur apoptose. En effet, il a été observé que les TEX de mélanomes métastatiques porteurs de PD-L1 suppriment la fonction des LT CD8⁺ favorisant la progression tumorale (Chen *et al.*, 2018). Iero *et al.* ont démontré que l'expression de FasL et de TRAIL à la surface des exosomes permettait aux TEX d'induire l'apoptose des LT spécifiques des tumeurs (Iero *et al.*, 2008).

Outre une action sur les LT les TEX sont capables de moduler la réponse des NK en diminuant leur activation. De même, les TEX vont altérer le recrutement, la migration, la différenciation et les propriétés fonctionnelles des monocytes (Richards, Hettinger and Feuerer, 2013). Les macrophages et les cellules dendritiques (DC) sont des cellules essentielles dans la présentation antigénique, la phagocytose et l'immunomodulation. Différentes études montrent une communication entre les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et les TEX qui peuvent réguler le phénotype et la fonction des TAM en faveur d'un phénotype protumoral immunosuppresseur M2 (Z. Cheng *et al.*, 2021; Hao *et al.*, 2022). Concernant les cellules dendritiques, les TEX ont été décrit comme inhibant la différenciation des DC ce qui perturbe l'activation et la réponse des LT induite par les DC (Hao *et al.*, 2022). Les MDSC (myeloid-derived suppressor cells) constituent une population hétérogène de cellules myéloïdes

immatures qui se composent principalement de précurseurs des DC, des macrophages et des granulocytes (Kumar *et al.*, 2016). Enfin, dans le microenvironnement tumoral, il a été rapporté que les TEX à travers les miARN et les protéines qu'ils contiennent, jouent un rôle dans le développement, la survie et l'immunosuppression induite par les MDSC (Tian *et al.*, 2019). Ces MDSC en retour vont moduler la réponse immunitaire antitumorale permettant l'échappement de la tumeur et son développement.

Ainsi les exosomes tumoraux occupent une place centrale dans le développement tumoral et l'évasion à la réponse anti-tumorale. Mon sujet portant principalement sur les exosomes tumoraux de carcinome de nasopharynx, nous aborderons plus précisément dans la partie suivant le rôle des exosomes tumoraux de CNP.

E. Rôle dans la carcinogénèse et la régulation de la réponse immunitaire au CNP

Chez les patients atteints de CNP à partir des sérums, des exosomes dérivés du CNP ont été identifiés. Parmi ces exosomes sont susceptibles d'être retrouvé des exosomes provenant des toutes les cellules pouvant en sécréter, c'est-à-dire à la fois des exosomes de cellules tumorales de CNP (ExoCNP) (Harmati *et al.*, 2017) ou de cellules infectées par EBV (ExoEBV) (Zuo *et al.*, 2017). En plus de ces exosomes, des exosomes dérivés de cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont associés *in vitro* au développement du CNP (Shi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Des exosomes de cellules immunitaires sont également susceptibles d'être présents. Toutes ces microvésicules extracellulaires jouent différents rôles dans la prolifération cellulaire, l'angiogénèse, la communication intercellulaire, l'invasion tumorale ainsi que la régulation de la réponse immunitaire et les interactions tumeurs cellules hôtes.

i. Rôles dans le développement du CNP

Les exosomes présents au sein des tumeurs de CNP modulent différents aspects de la carcinogénèse tels que l'angiogénèse, la croissance tumorale, l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), l'invasion, les métastases ou encore les résistances aux radiothérapies et chimiothérapies. Les ExoEBV comportent les différents protéines et ARN de la latence II d'EBV. Parmi ces molécules, les ARN EBERs sont capables de protéger les cellules tumorales de l'apoptose, favorisant la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de la signalisation IGF1 et l'expression d'EBER dans des cellules EBV négative accentue la croissance de ces cellules (Iwakiri, 2016). De même, l'oncogène majeur d'EBV, LMP1 active

les différentes voies de signalisation NF- κ B, PI3K/AKT, ERK-MAPK, JNK/STAT et p38/MAPK participant à la résistance à l'apoptose et à la prolifération cellulaire. Parallèlement, il a été montré qu'LMP1 et LMP2 peuvent inactiver l'expression de Bcl-2 et des survivines *via* la voie NF- κ B et AP-1 conférant une résistance à l'apoptose (Verweij *et al.*, 2011).

Les ExoCNP portent de nombreux miARN qui influencent le développement tumoral et notamment l'angiogenèse. Les miR-17-5p et miR-23a présents dans les exosomes sont des promoteurs de l'angiogenèse en ciblant BAMBI et TSGA10 (Bao *et al.*, 2018, p. 10; Duan *et al.*, 2019). De plus, différents travaux montrent un rôle important des exosomes dans l'EMT, l'invasion, la migration et le développement des métastases. Par exemple, le miR-310a-3p cible l'ARNm de BTGA et favorise l'invasion et l'EMT dans le CNP (Q. Cheng *et al.*, 2021) et le miR-BART-10-3p induit l'EMT et favorise la mise en place des métastases (Yan *et al.*, 2015). Wang *et al.* ont montré que l'expression d'EBNA1 dans les cellules de CNP diminue la présence des marqueurs épithéliaux laissant place à ceux mésenchymateux caractéristiques de l'EMT (Wang *et al.*, 2014). L'oncogène majeur d'EBV LMP1, à travers la régulation des voies Twist, Snail et SatB1 module la matrice extracellulaire par l'induction de la MMP9 (Matrice Métalloprotéase 9) (Horikawa *et al.*, 2000; Nkosi *et al.*, 2020; Lo *et al.*, 2021). Enfin, la protéine LMP2 présente au sein des exosomes interagit avec l'oncogène LMP1 dégradant p53 menant à l'expression de c-myc *via* la voie PI3K/AkT induisant les métastases du CNP (Raab-Traub, 2015).

Les ExoCNP sont également capables de procurer aux cellules tumorales une résistance à la fois aux radiothérapies et aux chimiothérapies. En effet, il a été montré que des cellules de CNP résistantes au Taxol transféraient *via* les exosomes DDX53 (dead box helicase 53) procurant une résistance au Taxol aux autres cellules à travers l'augmentation de MDR1 (Yuan and Zhou, 2021). De même, le miR-20a-5p sécrété par les cellules de CNP radiorésistance, favorise la radiorésistance des cellules cibles (D. Huang *et al.*, 2017) à travers l'expression de Rab27B mais le mécanisme sous-jacent reste à déterminer. De plus, il a été démontré qu'LMP1 présent dans les exosomes induisait l'effet Warburg dans les cellules de CNP. L'effet Warburg se caractérise par un métabolisme des cellules principalement dépendant de la glycolyse et ce même en présence de dioxygène. L'induction de ce métabolisme par LMP1 induit une augmentation de la régulation d'HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α) et de l'héxokinase 2 importante dans le fonctionnement de la glycolyse. Ceci induit en retour des transformations malignes, la prolifération cellulaire ainsi que la résistance aux radiothérapies (Su *et al.*, 2022). De même, LMP1 au niveau des exosomes stimule l'expression de CD44 menant à la dérégulation des gènes pro-apoptotique cibles de p53 suggérant une inactivation de l'apoptose

dépendante de p53 (Yang *et al.*, 2014). Une autre étude montre que le silencing de LMP1 mènent à une inhibition de la voie AKT et des facteurs phospho-FOXO1 en aval rendant de nouveaux les cellules de CNP sensible à la radiothérapie (Mei *et al.*, 2007).

En résumé les exosomes présents dans le microenvironnement tumoral du CNP vont participer directement au développement de la tumeur en activant des voies impliquées dans la carcinogénèse et les résistances aux traitements. De plus ces exosomes vont impacter indirectement la progression tumorale en jouant sur la modulation de la réponse immunitaire anti-tumorale et anti-virale de l'hôte.

ii. Rôles dans l'immunorégulation liée au CNP

Les exosomes retrouvés dans le microenvironnement tumoral influencent indirectement le développement du CNP en modulant la réponse immunitaire de l'hôte favorisant l'échappement de la tumeur à la réponse anti-tumorale. En effet, ces exosomes portent différentes protéines notamment LMP1 et la galectine-9 (gal-9) possédant toutes deux des propriétés immunosuppressives très importantes (Klibi *et al.*, 2009). LMP1 possèdent dans sa partie N-ter une séquence immunosuppressive (LALLFWL) inhibant la prolifération des cellules T (Dukers *et al.*, 2000). De plus, *via* l'activation des voies NF- κ B et STAT3, LMP1 augmente la sécrétion de cytokines immunomodulatrice dont IL-18 et IP-10 intervenant dans le recrutement et la suppression des cellules T CXCR3⁺ et des macrophages (Vockerodt *et al.*, 2005). LMP1 et l'IFN- γ peuvent augmenter l'expression de PD-L1 dans les cellules de CNP par le biais des voies MAPKs/AP-1, JAK3/STAT3 et NF- κ B (Fang *et al.*, 2014). Parallèlement, la production d'IL-18 induite par LMP1 favorise la sécrétion de l'IFN- γ et l'expression de PD-1 sur les cellules T CXCR3⁺ et les cellules NK permettant la suppression de la réponse anti-tumorale. Hormis LMP1, la galectine-9 joue un rôle primordial dans l'immunosuppression dans le CNP. La galectine-9 est un ligand de TIM-3, un récepteur inducteur de mort qui a pour fonction de limiter la réponse immunitaire. La gal-9 induit une boucle de régulation par l'induction de l'apoptose des cellules Th1 en se liant à TIM-3 (Zhu *et al.*, 2005; Klibi *et al.*, 2009). La gal-9 favorise également la différenciation et l'expansion des Treg CD25⁺Foxp3⁺ (John and Mishra, 2016). Les exosomes contenant la Gal-9 sont détectés à la fois dans le sérum des patients et dans les souris xénotransplantées avec des tissus de CNP. De plus, Zhang et ses collaborateurs ont mis en évidence que la Gal-9 inhibe la voie STING et stimule les cellules myéloïdes CD33⁺ qui produisent de l'IL-1 β et de l'IL-6 responsables en retour de la différenciation et de l'expansion des MDSC à partir des cellules myéloïde CD33⁺ (C.-X. Zhang

et al., 2020). Il est également intéressant de noter que LMP1 interagit avec Gal-9 dans les exosomes dérivés de CNP, bien que Gal-9 ne soit pas recruté dans les radeaux lipidiques par LMP1 et que son expression ne soit pas induite par LMP1.

En outre, les exosomes agissent sur l'émergence, la fonction suppressive des Treg (Mrizak *et al.*, 2015; Mustapha, 2016) impliqués directement dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale. EBNA1 est capable de convertir les LT naïfs en Treg et favorise la chimioattraction et la migration des Treg *via* la surexpression de l'axe TGF- β 1, SMAD3-PI3K-AKT-c-JUN. Cette activation en retour induit la production de la chimiokine CXCL12 recrutant les Treg par le récepteur CXCR4 (Huo *et al.*, 2020). L'expression d'EBNA1 permet la production de la chimiokine CCL20 impliqué dans le recrutement des Treg au niveau tumoral (Mrizak *et al.*, 2015). Enfin les macrophages polarisés en M2 par les cellules exprimant EBNA1 induisent la conversion des T naïfs en Treg (Jie Wang *et al.*, 2020).

Les différents ARN et miARN des exosomes vont inhiber la réponse immunitaire et permettre le développement du CNP. Les ARN EBER sont capables de déclencher la production de MCP-1 (Monocytes chemoattractant protein-1) et de M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) recrutant les macrophages au site tumoral qui se différencieront ensuite en macrophages associés à la tumeur (TAM) (Takada, 2012). Les miARN dont les miR-24-3p, miR-891a, miR-106a-5p, miR-20a-5p, et miR-1908 altèrent la prolifération et la différenciation des LT. Le miR-24-3p module la phosphorylation des protéines ERK et STAT altérant la prolifération des LT, la différenciation des TH1 et TH17 et favorisant en retour la différenciation des Treg Foxp3+ (Ye *et al.*, 2014, 2016).

Ainsi les exosomes tumoraux dérivés de CNP participent activement au développement des cellules tumorales d'une part à travers la modulation de la prolifération, de l'invasion, des métastases et des résistances aux traitements conventionnels. D'autre part, ils jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire permettant l'échappement du CNP et son développement.

II- Le Carcinome du Nasopharynx

A. Généralités et stade de développement du CNP

Le carcinome du nasopharynx (CNP), est une tumeur épithéliale qui se développe dans les muqueuses rhinopharyngées. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le carcinome du nasopharynx est classé en 3 sous pathologies : les carcinomes squameux kératinisant, les carcinomes non kératinisant et les carcinomes basaloïdes. Les carcinomes kératinisant représentent environ 20% des cas mondiaux et sont rares dans les régions endémiques comme le sud de la Chine. En revanche, les carcinomes non-kératinisant représentent plus de 95% des cas dans les régions endémiques et sont très souvent associés à une infection par le virus d'EBV (Pathmanathan *et al.*, 1995; H.-Y. Wang *et al.*, 2016). Le sous-type non kératinisant se divise en deux catégories, les carcinomes différenciés et les carcinomes non différenciés (H.-Y. Wang *et al.*, 2016). Dans cette thèse, nous nous intéressons aux carcinomes du nasopharynx non-différenciés.

Le CNP est classé selon la classification TNM (Tumeur – Nodules – Métastases) de l'Union internationale contre le cancer et du Comité mixte américain sur le cancer (UICC/AJCC). Ce système de classification prend 3 facteurs en considération : (T) pour la caractéristique de la tumeur primaire, (N) pour le statut de propagation de la tumeur dans les ganglions lymphatiques et (M) pour le statut métastatique hors de la zone de développement de la tumeur primaire. Le tableau 3 présente la classification TNM du CNP. Ainsi avec cette classification TNM sont établis les stades de développement du CNP (**Tableau 1**).

Tableau 1 : 8ème édition du système de classification UICC/AJCC pour le CNP (Chen et al., 2019)

Tumeur primaire (T)	
TX	La tumeur primaire ne peut être évaluée
T0	Aucune tumeur identifiée, mais présence d'un ou plusieurs ganglions cervicaux EBV-positifs
T1	Nasopharynx, oropharynx ou cavité nasale sans extension parapharyngée
T2	Extension parapharyngée, atteinte des tissus mous adjacents (ptérygoïde médial, ptérygoïde latéral, muscles pré-vertébraux)
T3	Structures osseuses (base du crâne, vertèbre cervicale) et/ou paranasaux
T4	Extension intracrânienne, nerf crânien, hypopharynx, orbite, atteintes étendues des tissus mous (au-delà de la surface latérale du muscle ptérygoïde latéral, glande parotide)
Ganglions lymphatiques régionaux (N)	
NX	Les ganglions lymphatiques régionaux ne peuvent pas être évalués
N0	Pas de métastases régionales des ganglions lymphatiques
N1	Atteintes des ganglions lymphatiques cervicaux unilatéraux, unilatéraux ou bilatéraux rétropharyngée ≤ 6 cm, au-dessus du bord caudal du cartilage cricoïde
N2	Métastase bilatérale dans un ou plusieurs ganglions lymphatiques ≤ 6 cm, au-dessus du bord caudal du cartilage cricoïde.
N3	Métastases >6 cm et/ou sous le bord caudal du cartilage cricoïde (indépendamment de la latéralité)
Métastases à distance (M)	
M0	Pas de métastases à distance
M1	Métastases à distance
Stade de développement	
I	T1 N0 M0
II	T2 N0-1 M0, T0-1 N1 M0
III	T3 N0-2 M0, T0-2 N2 M0
IVA	T4 ou N3 M0
IVB	Tous les stades T, tous les stades N, M1

B. Épidémiologie

Le carcinome du nasopharynx en comparaison avec les autres cancers, est relativement rare. Selon le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC), en 2020, 133 354 nouveaux cas de CNP ont été diagnostiqués représentant 0,7% des cancers dans le monde (Sung *et al.*, 2021). Le CNP présente une répartition géographique particulière avec une forte incidence principalement en Asie et dans le croissant maghrébin (**Figure 4A**). En effet, 85,3% des nouveaux cas se situent en Asie et plus précisément en Asie de l'Est et du Sud-Est (**Figure 4B**) suivi de l'Afrique avec environ 8% des nouveaux cas en 2020. En Asie du Sud, le CNP est le 10^{ème} cancer le plus fréquent (Ferlay *et al.*, 2021). En Chine, le CNP touche 3 personnes sur 100 000, tandis que l'incidence est plus importante dans les populations cantonaises notamment dans la province du Guangzhou, où 13,9 hommes sur 100 000 contre 5,2 femmes sur 100 000 développent un CNP, ou à Hong Kong (12,8 pour 100 000 chez les hommes, 4,0 pour 100 000 chez les femmes) (Su *et al.*, 2022). D'autres zones géographiques sont très impactées par le CNP. En effet, le Brunei présente l'incidence la plus élevée de CNP (13,35/100 000 chez les hommes, 6,44/100 000 chez les femmes) suivi des Maldives (10,67/100 000 chez les hommes, 3,3/100 000 chez les femmes), de l'Indonésie (10,71/100 000 chez les hommes, 3,03/100 000 chez les femmes), de la Malaisie (9,53/100 000 chez les hommes, 3,5/100 000 chez les femmes) et le Vietnam (8,12/100 000 chez les hommes, 2,79/100 000 chez les femmes) (Chang *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2022).

Systématiquement, l'incidence est 2 à 3 fois plus élevée chez les hommes (96 371) que chez les femmes (36 983). De plus, l'incidence chez les personnes originaires du Sud de la Chine reste élevée même après qu'elles aient immigré dans des régions non endémiques. Cependant, une diminution de l'incidence est visible chez ces populations immigrées dès la deuxième génération (Yu and Hussain, 2009). Toutes ces observations dans la répartition et l'incidence des CNP témoignent d'une combinaison de facteurs à la fois génétiques, ethniques et environnementaux favorisant le développement des CNP.

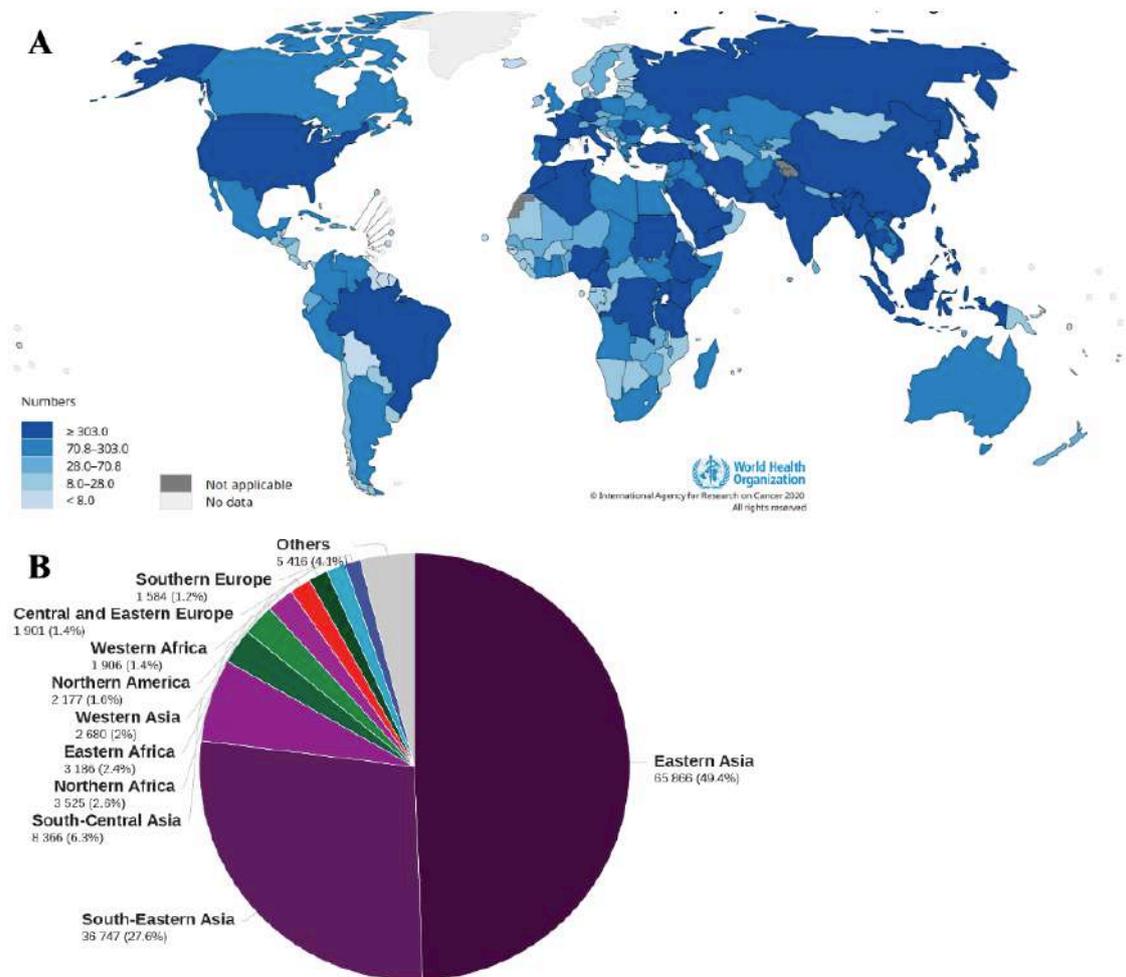


Figure 4 : Répartition mondiale des cas de carcinome du nasopharynx en 2020. (A) Estimation du taux d'incidence tout âge confondu (B) Estimation du nombre de cas en 2020 dans les différentes zones du monde (Sung et al., 2021; Ferlay et al., no date).

C. Étiologie

Plusieurs facteurs génétiques, environnementaux notamment la consommation de certains aliments, le tabagisme et la consommation d'alcool ainsi qu'une infection virale sont associés à des risques accrus de CNP (Chen *et al.*, 2019; Linton *et al.*, 2021). La **figure 5** résume les différents facteurs pouvant être associés à un risque accru de CNP.

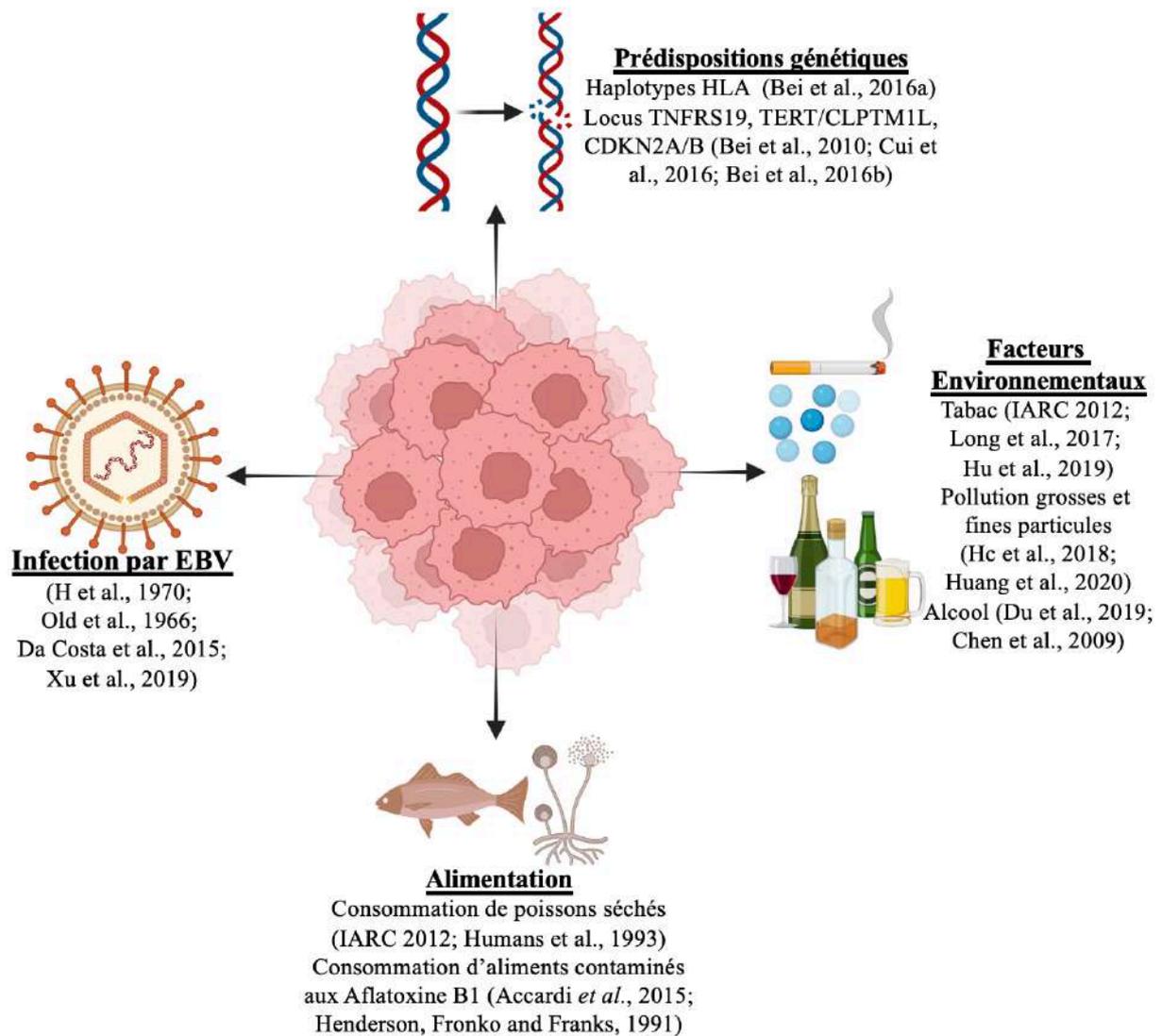


Figure 5 : Facteurs associés à un risque de développement de CNP réalisée par (Anthony LEFEBVRE).

i. Facteurs de risques non viraux

a) Prédispositions génétiques

Tel que mentionné précédemment, les cas de CNP sont 2 à 3 fois plus fréquents chez les hommes que chez les femmes. Cette disparité peut s'expliquer par la présence d'une susceptibilité génétique sur le chromosome X conférant un risque de CNP plus important chez les hommes (X.-Y. Zuo *et al.*, 2019). Shao-Hua *et al.* ont également rapporté que les estrogènes pourraient jouer un rôle protecteur du CNP chez les femmes (Xie *et al.*, 2013) expliquant cet écart d'incidence. Considérant en plus, la diminution d'incidence entre génération d'immigré originaire d'Asie (Yu and Hussain, 2009), cela conforte l'idée de la présence de prédispositions génétiques pour le développement du CNP. De nombreuses études ont permis d'identifier des

gènes de susceptibilité augmentant le risque de CNP. Les gènes HLA présents dans le chromosome 6p21 sont connus depuis longtemps comme des loci de risques majeurs pour le développement de CNP (Tang *et al.*, 2010). Il a notamment été décrit que les allèles HLA-A*0206, HLA-B*3802 ainsi que les haplotypes A*0207–B*4601 et A*3303–B*5801 sont associés à un risque accru de CNP. Inversement les allèles HLA-A*1101, HLA-B*27, et HLA-B*55 sont associés à des risques réduits de développement de CNP (Tang *et al.*, 2010). D'autres locus ont également été associés à l'apparition du CNP comme TNFRS19 sur le chromosome 13q12, MECOM sur le 3q26, CDKN2A/B sur le 9p21 et CLPTM1L/TERT sur le chromosome 5p151 (Bei *et al.*, 2010, 2016; Cui *et al.*, 2016). Plus récemment, il a été montré que les variants germinaux hétérozygotes de MST1R sont fortement associés à l'apparition précoce de CNP. MST1R est un récepteur présent à la surface des cellules stimulants les macrophages de type 1, jouant un rôle important dans la réponse immunitaire anti-virale.

En accord avec ces premiers travaux, d'autres études ont mis en évidence des changements génomiques stimulant le développement et la progression du CNP. Parmi ces changements nous retrouvons des mutations pertes de fonctions des régulateurs négatif de la voie NF- κ B, des lésions génétiques incluant la perte de locus CDKN2A/CDKN2B, l'amplification CCND1, la mutation de TP53, des mutations dans la voie de signalisation PI3K/MAPK ainsi que des modifications de la chromatine ou de la réparation de l'ADN (D.-C. Lin *et al.*, 2014; H. Zheng *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

b) Facteurs environnementaux : Style de vie

Le tabagisme a depuis longtemps été classé par le CIRC comme cause du CNP chez l'homme (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012). Le tabagisme est plus souvent associé aux CNP de type I à cellules squameuses plutôt qu'aux CNP non-kératinisant de type II et III. En effet, deux méta-analyses montrent un risque d'environ 60% plus élevé chez les fumeurs que chez les personnes non-fumeurs (Long *et al.*, 2017). L'augmentation du risque de CNP est principalement dû à une réactivation du cycle latent d'EBV, suggéré par une association positive entre le tabagisme et le niveau élevé d'anticorps IgA anti-EBV (Hu *et al.*, 2019; Hsu *et al.*, 2020). Néanmoins, plusieurs études menées dans des régions à forte incidence et où la grande majorité des CNP sont non-kératinisant ne démontrent qu'un risque légèrement accru de CNP associé au tabagisme.

Autre que le tabagisme, la mastication de noix d'arec (noix de bétel) est classée par le CIRC comme agent causal des cancers oraux et de l'œsophage chez l'homme. A ce jour une

étude a pu faire une association positive entre la mastication de noix d'arec et le développement de CNP après l'âge de 40 ans à Taiwan (Yang *et al.*, 2005).

La pollution atmosphérique a également été étudiée pour de possibles liens avec le développement de CNP. La pollution de l'air extérieur a été évaluée dans deux études à Taiwan qui ont démontrées des associations positives avec les niveaux de particules fines et de grosses particules (He *et al.*, 2018; H.-C. Huang *et al.*, 2020). En revanche, une autre étude sur dix villes chinoises n'a pas pu mettre en évidence une association de la pollution de l'air avec le risque de CNP (Yang *et al.*, 2020).

c) Facteurs environnementaux : Alimentation

La consommation de poisson salé dans les populations chinoises est répertoriée comme cause du CNP par le CIRC (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012). De même, la consommation de légumes marinés traditionnels asiatique est classée par le CIRC comme possiblement cancérigène pour l'homme sur la base de preuve épidémiologique sur le CNP, le cancer de l'estomac et de l'œsophage (Chang *et al.*, 2021). De plus, la consommation d'aliments conservés dans le sel dans le sud de la Chine, en Asie du Sud-Est, en Afrique du Nord au Moyen-Orient et dans l'Arctique peut expliquer la répartition particulière du CNP. Le mécanisme cancérigène sous-jacent à la consommation de poisson salé repose sur l'exposition à certains N-nitrosamines, mutagène bactériens, des génotoxines directes réactivant EBV (Humans, 1993; IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012). De plus, différents travaux ont démontré une association accrue au risque de CNP avec des régimes riches en graisses saturées, glucides ou riches en produits animaux et en amidon (Shivappa *et al.*, 2016; Abe *et al.*, 2018).

Contrairement à la consommation d'aliments salés, l'association entre l'alcool et le risque de CNP est très controversée. En effet, il est observé une absence de résultats dans les régions à forte incidence, mais des résultats positifs dans d'autres études dans les populations à forte et faible incidence (Chen *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2019). Par exemple, deux méta-analyses ont montré une association positive pour la catégorie d'alcool la plus forte en comparaison aux alcool légers. Néanmoins, des études prospectives menées à Singapour et Shanghai et plus récemment dans le sud de la Chine ne montrent pas d'association particulière entre la consommation d'alcool et le risque de CNP (Friborg *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2021). Ces discordances sont probablement liées à des biais contribuant aux résultats positifs des études cas-témoins.

Inversement à la consommation d'aliments salés, la consommation de fruits frais ou de légumes joue un rôle protecteur contre le CNP (Gallicchio *et al.*, 2006). En effet, les potentiels antioxydant, anti-inflammatoire et anti-nitrosation présents dans les fruits et légumes sont inversement corrélés au risque de CNP (Chang *et al.*, 2021). De façon identique, des régimes alimentaires sains ou riches en aliments frais sont associés à de moindre risque de CNP dans le sud de la Chine (C. Wang *et al.*, 2016) et à Taïwan (Lo *et al.*, 2016). Par ailleurs, il a été rapporté un rôle des mycotoxines aflatoxines B1 (AFB1) contenues dans les aliments contaminés dans la propagation de l'infection par EBV (Accardi *et al.*, 2015). L'exposition aux AFB1 favorise l'activation du cycle lytique d'EBV et augmente la charge virale. AFB1 participe également au déclenchement de la transformation cellulaire induite par EBV dans les cellules B primaire et est un cofacteur dans la carcinogenèse médiée par EBV (Henderson, Fronko and Franks, 1991).

ii. Facteurs de risques viraux : virus d'Epstein-Barr (EBV)

a) Mise en évidence d'EBV

La découverte du virus d'Epstein-Barr (EBV) découle d'une étroite collaboration entre Denis Burkitt, son étudiante Yvonne Barr et Anthony Epstein au début des années 1960 (Epstein, 2015). En 1958, Denis Burkitt jeune chirurgien décrit pour la première fois le Lymphome de Burkitt (BL) (Burkitt, 1958). Ce dernier pratiquait la chirurgie au département de chirurgie de l'école de médecine du collège Makerere en Uganda lorsqu'il a été confronté à des enfants atteints de tumeurs agressives dans lesquelles les lymphocytes B (LB) prolifèrent de façon anarchique. En 1961, il donne une conférence à Londres dans laquelle il présente ses travaux sur le lymphome de Burkitt. Il rencontre alors Anthony Epstein jeune chercheur à l'école de médecine de Middlesex travaillant sur la microscopie électronique et le virus du sarcome Rous, premier virus connu pour causer un développement tumoral chez la volaille. Après cette rencontre, une collaboration entre Burkitt et Epstein mène à l'étude de biopsies de tumeurs d'enfants africains atteints de lymphome de Burkitt par Epstein et son étudiante Yvonne Barr. Après 3 ans d'études, ils mettent en évidence par microscopie électronique la présence de cellules cancéreuses contenant des particules virales (Epstein *et al.*, 1965) comme le montre la **Figure 6**. Ainsi le virus d'Epstein-Barr a été le premier oncovirus humain décrit et relié dans un premier temps au développement des Lymphomes de Burkitt. D'autres études ont ensuite montré qu'EBV est également associé à d'autres cancers tels que le Lymphome de Hodgkin (LH) (Levine *et al.*, 1971; Hjalgrim *et al.*, 2003; Münz, 2019), le Lymphome non-Hodgkinien (LNH) (Levine *et al.*, 1971), les désordres lymphoprolifératifs, certains cancers

gastriques (Shibata *et al.*, 1991), les carcinomes du Nasopharynx (CNP) (Old *et al.*, 1966; H *et al.*, 1970; Wang and Ning, 2021) ainsi que de multiples tumeurs malignes se développant chez des personnes atteintes d'une immunodéficience héréditaire ou acquise (Thorley-Lawson and Gross, 2004). Plus récemment, différentes études ont montré que l'infection par EBV est associée aux scléroses multiples et serait une condition préalable à la pathologie (Ascherio and Munger, 2016; Bjornevik *et al.*, 2022; Soldan and Lieberman, 2022).

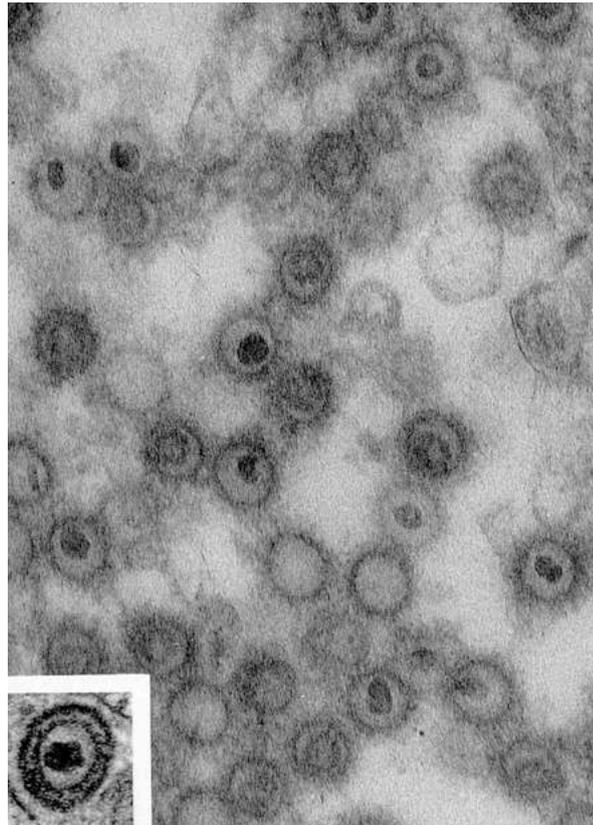


Figure 6 : Image au microscope électronique du virus d'Epstein-Barr. Assemblage de virions immatures dans le cytoplasme de cellules de lymphomes EB1 (Epstein, 2015).

b) Épidémiologie

L'EBV est le virus humain le plus ubiquitaire, infectant au moins 90% de la population adulte dans le monde. Lors de la primo infection, les particules virales infectent tout d'abord les cellules B dans les cryptes de l'amygdale. Ces dernières deviennent transformées, se répliquent dans le centre germinatif créant un réservoir de virus. Certaines cellules B deviennent des cellules B matures infectées avec différents types de latences. Les cellules en latence 0 correspondent aux cellules B mémoires permettant au virus de persister dans l'hôte. La primo infection est généralement asymptomatique mais peut évoluer en mononucléose infectieuse

(MI). L'infection par EBV survient généralement durant l'enfance à des âges différents principalement en fonction de la localisation géographique ainsi que de l'ethnie des populations (de-Thé *et al.*, 1975). En effet, dans les pays développés il a été observé un taux d'infection plus élevé chez les enfants de 2 à 4 ans, les adolescents et jeunes adultes entre 14 et 18 ans avec une augmentation en fonction de l'âge. Par ailleurs, des études récentes ont démontré que cette primo-infection est en baisse chez les enfants de 6 à 19 ans aux États-Unis passant de 72% entre 2003-2004 à 65% entre 2009-2010 (Balfour, Sifakis, *et al.*, 2013). Ces variations ont également été observé en Angleterre, au Pays de Galles et au Japon (Takeuchi *et al.*, 2006). En revanche, dans les pays en développement, lorsque les conditions hygiéniques sont dégradées, l'infection par EBV a lieu plus précocement chez les jeunes enfants dont près de 100% sont positif à EBV avant l'âge de 6 ans. Cette infection précoce, serait un facteur expliquant le risque plus élevé de développer un CNP chez ces populations.

La transmission du virus se fait généralement par sécrétion orale *via* la salive. Il a également été décrit des cas de transmission d'EBV suite à des transplantations de cellules hématopoïétiques (Shapiro *et al.*, 1988) ou à des greffes d'organes (Vergheze *et al.*, 2015). Dès lors l'infection par EBV peut évoluer en désordres lymphoprolifératifs post transplantation.

c) Caractéristiques générales

EBV fait partie de la famille des gammaherpesvirus et est également connu sous le nom d'herpesvirus humain de type 4 (HHV-4). La structure d'EBV est similaire à celle des autres herpesvirus. Il est constitué d'un ADN double brin entouré d'une capsidie protéique icosaédrique contenant 162 capsomères. Entre le nucléocapside et l'enveloppe externe, se trouve un tégument protéique constitué de glycoprotéines jouant un rôle dans le tropisme et la reconnaissance cellulaire. Enfin, l'enveloppe contient des protéines de surface et des glycoprotéines qui permettent au virus d'infecter les cellules cibles (Germi *et al.*, 2012). L'ensemble du virion à l'état mature possède un diamètre de 120 à 180nm (**Figure 7**).

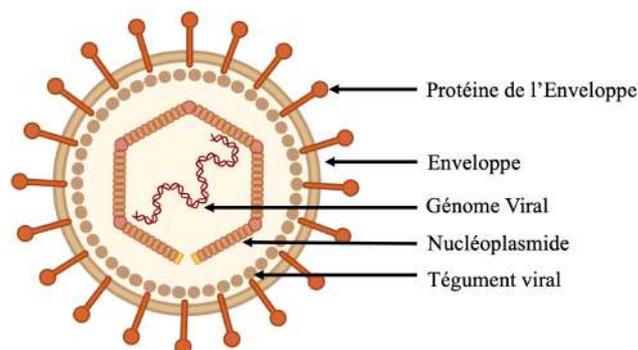


Figure 7 : Structure du virus d'Epstein-Barr réalisée par (Anthony LEFEBVRE).

En 1984, Baer et ses collaborateurs séquencent complètement pour la première fois le génome d'EBV (Baer *et al.*, 1984) (**Figure 8**). La structure du génome d'EBV consiste en un ADN linéaire double brin d'environ 172 Kbp de long codant pour environ 100 gènes et 44 microARN (Chen *et al.*, 2010).

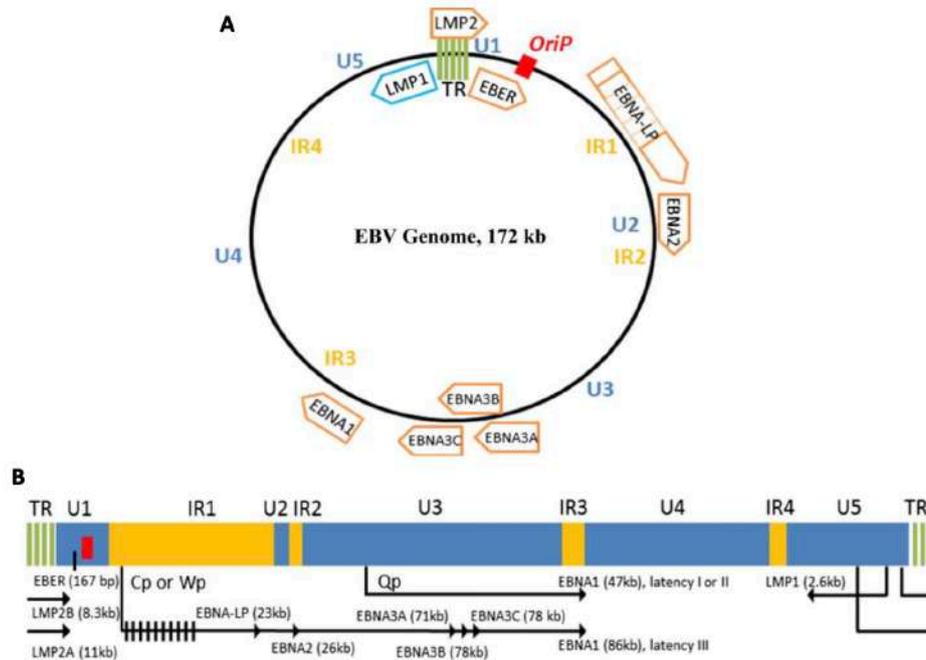


Figure 8 : Représentation schématique du génome d'EBV. (A) Diagramme circulaire du génome d'EBV. L'origine de réplication du plasmide est montrée en rouge. Les domaines U1 à U5, IR1 à IR4, TR sont indiqués. Les flèches avec les protéines de latence d'EBV indiquent dans quel sens sont transcrits les protéines de latence d'EBV. (B) Schéma représentant de façon proportionnelle à leur taille, les régions uniques, (U1 – U5), les répétitions internes (IR1 – IR4), la répétition terminale (TR) et le cadre ouvert de lecture (*OriP* en rouge). Sont également indiquées les localisations des exons pour les protéines membranaires de latence d'EBV ainsi que les protéines nucléaires. Le transcrit LMP1 à une direction opposée aux autres transcrits de gènes. LMP2 ne peut être transcrit que lorsqu'EBV forme un épisome étant donné que son gène se situe dans la TR. Les protéines EBNA sont transcrites à partir d'un transcrit EBNA primaire épissé différemment. En latence III, EBNA1 est transcrit à partir des promoteurs Cp et Wp alors qu'il est initié par le promoteur Qp pour les latences I et II (Ok *et al.*, 2013).

d) Cycle de vie d'EBV

Lors de la primo infection par EBV transmet oralement, le virus cible tout d'abord les cellules B de l'oropharynx. Le virus établit ensuite une infection lytique des cellules voisines, à la fois des cellules épithéliales et des lymphocytes B (Shannon-Lowe and Rickinson, 2019). Ensuite, le virus initie une infection de latence III dans les cellules B des organes lymphoïdes. Certains lymphocytes B en latence III échappent à une reconnaissance immunitaire en dérégulant l'expression d'antigène et peuvent ainsi établir un pool de lymphocytes B mémoires en latence 0 circulant entre le sang et les tissus lymphoïdes. Dans cette latence 0, l'infection

virale persiste dans l'hôte. Ces cellules B mémoires infectées en latence 0 subissent une réactivation du cycle lytique menant à la production importante de virions, infectant les cellules épithéliales mais également les cellules B naïves adjacentes qui compléteront le pool de cellules B mémoire infectées (**Figure 9**) (Taylor *et al.*, 2015; Münz, 2019; Shannon-Lowe and Rickinson, 2019).

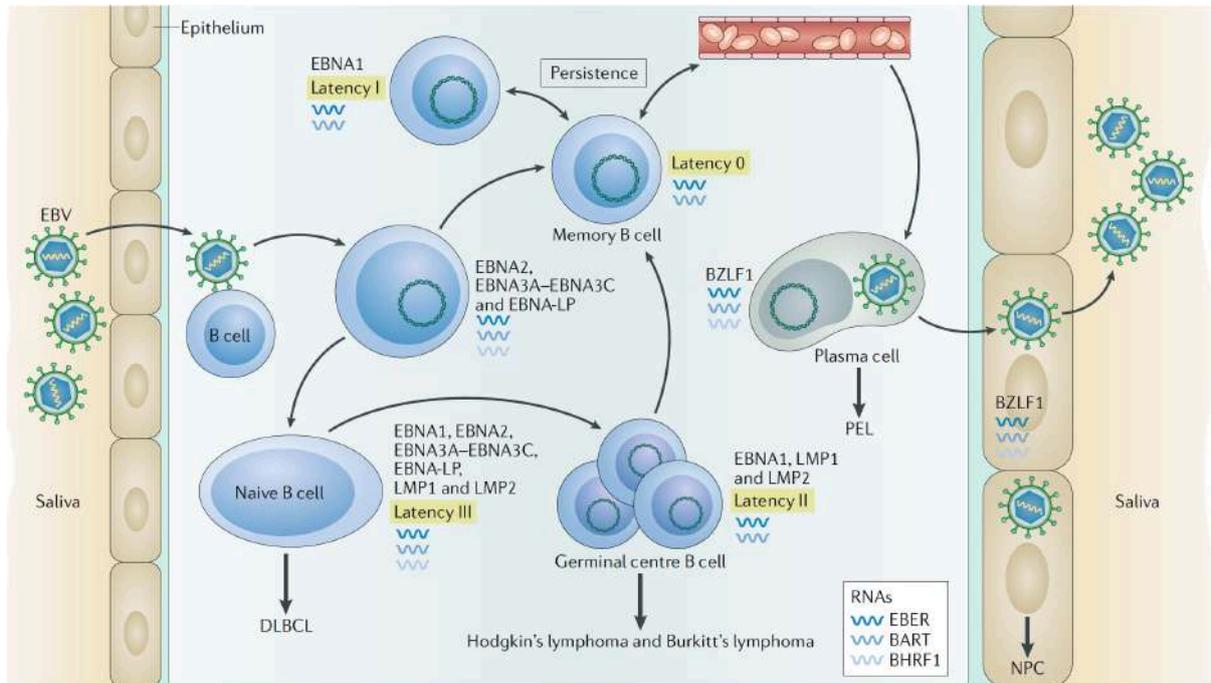


Figure 9 : Modèle d'infection latente par le virus d'Epstein-Barr permettant une persistance virale dans l'hôte. EBV persiste dans les cellules B mémoires circulantes en latence 0 dans lesquelles aucune protéine virale ne s'exprime. Pendant la phase de prolifération homéostatique des cellules B mémoires EBNA1 sont exprimées. Après avoir traversé l'épithélium de la muqueuse à partir de la salive, EBV infecte les cellules B présentes dans les tissus lymphoïdes comme les amygdales. Dans les cellules B mémoires infectées EBV peut directement rentrer en phase de latence 0. De plus, EBV infecte les cellules B naïves et exprime un profil de latence III avec l'expression des protéines EBNA1, EBNA2, EBNA3 A-C, LMP1 et LMP2. Cette activation en latence III conduit à la différenciation du centre germinatif des cellules B de latence II puis en cellules B mémoires de latence 0. A partir des cellules B mémoires circulantes EBV réactive le cycle lytique lors de la différenciation en plasmocytes. Cette réactivation lytique permet l'infection des cellules épithéliales qui donne lieu à des carcinomes associés à EBV comme le CNP (Münz, 2019).

1. Phase lytique d'EBV

La phase lytique d'EBV permet principalement la production de virions infectieux qui sont nécessaires pour la transmission du virus. Cette phase peut survenir à la fois lors de l'infection primaire et également lors d'une réactivation de la phase latente en phase lytique. Lors de cette phase, la réplication de l'ADN d'EBV est initiée par le cadre ouvert de lecture OriLyt et dépend principalement des protéines codées par EBV. Durant l'induction du cycle

lytique ou de la réactivation, deux facteurs de transcriptions d'EBV sont exprimés ZEBRA (BamHI Z fragment Epstein-Barr virus Replication Activator, ou BZLF1, Zta) et Rta (BRLF1) (Miller *et al.*, 2007). Ces deux protéines vont également induire l'expression de gènes précoces codants pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral (Fixman, Hayward and Hayward, 1995). Lors de la phase lytique de réplication, sont produits des facteurs assurant l'amplification du génome viral, la synthèse de protéines structurales, la formation de la capside virale et de nouvelles particules virales qui se propageront pour infecter d'autres cellules ou pour être transmis à d'autres individus.

2. Phase de latence d'EBV

Contrairement à la phase lytique de réplication, la phase latente d'EBV est suffisante et permet la propagation de l'infection dans les cellules de l'hôte. La phase de latence de réplication est caractérisée par l'expression d'un groupe restreint de gènes de latence codant pour 9 protéines de latence, 2 ARN non codant codés par EBV (EBERs) et 25 pré-microARN (miARNs) donnant 44 miARNs matures (Skalsky and Cullen, 2015; Thorley-Lawson, 2015; Wang *et al.*, 2018). Différents types de latences ont été décrits en fonction du profil d'expression des protéines de latences. De plus, les cellules infectées par EBV en latence I, II ou III sont associées à une ou plusieurs pathologies malignes spécifiques. Le **Tableau 2** résume les profils d'expressions des protéines de latences ainsi que les pathologies malignes associées aux différents types de latences d'EBV. La latence de type III est le programme qui se met en place suite à la primo infection des cellules B naïves. Ce programme permet la prolifération active des cellules B infectées. Cette latence est caractérisée par l'expression des protéines EBNA1, EBNA2, EBNA3s, LMP1 LMP2A/B ainsi que les petits-ARN EBERs et les miARNs BART et BHRF1 (Amoroso *et al.*, 2011). Tous ces éléments sont retrouvés dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (Iwakiri, Samanta and Takada, 2006), dans les lymphocytes B naïfs des amygdales de porteurs sains du virus ainsi que chez la plupart des cellules B des amygdales des personnes atteintes de mononucléose infectieuse (Babcock, Hochberg and Thorley-Lawson, 2000; Kurth *et al.*, 2000; A *et al.*, 2019). Concernant les pathologies malignes associées à la latence II, les protéines EBNA2 à EBNA6 ne sont pas exprimées (**Tableau 2**). Après l'activation de la latence III, les lymphocytes B entrent dans la réaction du centre germinatif et seul les protéines EBNA1, LMP1 et LMP2A/B ainsi que les petits-ARN EBERs et miARNs BART sont présents. Ce profil d'expression est caractéristique de la latence II d'EBV. Le passage à une latence de type II permet aux cellules B de survivre pendant la réaction du centre germinatif et de ne pas être éliminées par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques

(Khanna, Burrows and Moss, 1995). Les cellules B infectées vont ensuite se différencier en cellules B mémoire en latence 0 et pourront alterner entre la latence 0 et la latence I. Lors de la latence 0, aucune protéine de latence n'est exprimée, seul les petits-ARN EBERs et les miARNs BART sont présents dans les cellules B mémoires (Münz, 2019). Ce profil de latence rend les cellules B mémoires infectées circulantes invisibles au système immunitaire et permet au virus de se maintenir tout au long de la vie de l'hôte (Babcock *et al.*, 1998). La latence I est caractérisée par l'expression d'EBNA1, des petit-ARN EBERs et les miARNs BART. C'est seulement lors de la prolifération homéostatique des cellules B mémoires infectées que la protéine EBNA1 s'exprime de façon transitoire permettant la bonne répllication et répartition du génome viral entre les cellules filles à l'issue de la mitose (Hochberg *et al.*, 2004). Tout comme la latence III, les cellules dans lesquelles EBV est en latence de type II et I peuvent se transformer et donner des pathologies malignes spécifiques (**Tableau 2**). Seule la latence 0 n'est associée à aucune pathologie maligne.

Tableau 2 : Profil de latence d'EBV et pathologies malignes associées (Shannon-Lowe and Rickinson, 2019)

Type de latence	Protéines et ARN de latence exprimés	Pathologies malignes associées
Latence 3	EBNA1, EBNA2, EBNA3, LMP1, LMP2, petit-ARN EBERs, miARNs BHRF1 et BART	Désordres lymphoprolifératifs post-transplantation Lymphomes à large cellules B diffuses Lymphomes Non-Hodgkiniens
Latence 2	EBNA1, LMP1, LMP2, EBER miARNs BART	Carcinome du Nasopharynx Lymphomes NK/T Lymphomes Hodgkiniens
Latence 1	EBNA1, EBER, miARNs BART	Lymphomes de Burkitt Cancers Gastriques
Latence 0	EBERs et miARNs BART	

e) Réponse immunitaire contre EBV

1. Réponse Immunitaire innée contre EBV

Cellules Natural Killers

Les cellules Natural Killers (NK) sont des cellules connues pour leur rôle dans la réponse anti-tumorale et anti-virale (Cooper, Fehniger and Caligiuri, 2001) y compris lors d'infection par EBV. En effet, lors de la phase aiguë de la mononucléose infectieuse (MI) associée à EBV, une expansion importante des cellules NK est observée (Williams *et al.*, 2005; Abbott *et al.*, 2017). Parmi les cellules NK, les NK NKG2A⁺ sont les effecteurs principaux dans la lyse des cellules B EBV⁺. En effet, Azzi *et al.* ont mis en évidence chez des patients

atteints d'MI un enrichissement en NK NKG2A⁺, des cellules NK différenciées précocement (Azzi *et al.*, 2014). Peu de temps après, Hatton et ses collaborateurs ont démontré que les NK NKG2A⁺ saines issues des cellules mononuclées périphériques du sang (PBMCs) sont plus efficaces dans la destruction des cellules B EBV⁺ et la co-culture de ces NK avec des LCL autologues induit la production de l'IFN- γ et la dégranulation des NK NKG2A⁺ (Hatton *et al.*, 2016). Une étude plus récente a confirmé que ces NK CD56^{bright} NKG2A⁺ des amygdales sont plus effectrices pour limiter la prolifération des cellules B infectées par EBV par le biais d'une sécrétion d'IFN- γ et par l'engagement de NKP44 un membre des récepteurs cytotoxiques naturels (Jud *et al.*, 2017).

Monocytes / Macrophages

Les monocytes sont capables de reconnaître les virions EBV grâce au TLR2 (Toll-Like Receptors) à leur surface ou *via* le TLR9 reconnaissant les motifs CpG non-méthylés du génome d'EBV (Gaudreault *et al.*, 2007; Fiola *et al.*, 2010). La reconnaissance d'EBV par les monocytes *via* TLR2 et TLR9 induit la production d'IL-8, alors que seule l'activation du TLR2 permet la production de la chimiokine MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) et de la cytokine immunosuppressive IL-10 (Fiola *et al.*, 2010). La reconnaissance *via* le TLR2 induit l'activation de la voie NF- κ B de façon dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 (Ariza *et al.*, 2009).

De plus, Glasser *et al.* ont montré que la dUTPase d'EBV induit la production d'IL-10 et des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-8 par les macrophages dérivés de monocytes (MDM) (Glaser *et al.*, 2006) et ce de façon dépendante de la voie NF- κ B (Waldman *et al.*, 2008). De façon identique aux monocytes, les MDM sont décrits comme repérant EBV *via* les TLR2 et TLR9 entraînant la production de cytokines et chimiokines (Fiola *et al.*, 2010).

Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Elles possèdent différents récepteurs aux signaux de dangers appelés PRR (Pattern Recognition Receptor) qui ont pour fonction de capter les signaux de danger environnant pour ensuite activer la maturation des DC qui en retour activeront la réponse immunitaire adaptative. Dans tous ces PRR, nous retrouvons les TLR (Toll-like Receptor), les récepteurs de type oligomérisation de liaison aux nucléotides, les récepteurs inductible par l'acide rétinoïque et les récepteurs aux lectines de type C (Diebold, 2009; Dzopalic *et al.*, 2012).

Parmi les TLR, les TLR3 et TLR9 exprimés respectivement par les DC conventionnelles (cDCs) et par les DC plasmacytoïdes (pDCs) (Iwasaki and Medzhitov, 2004) forment la première barrière pour détecter et contrer EBV (**Figure 10**) (Chijioke, Azzi, *et al.*, 2013). Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin d'EBV notamment celui de l'ARN EBER dans les compartiments endosomaux des cDCs et induit la production de l'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires (Iwakiri *et al.*, 2009). Les pDCs sont connues pour leur production de cytokines anti-virales IFN de type I (IFN- α/β) (Reizis *et al.*, 2011). Lim *et al.* ont montré dans un modèle de souris SCID immunodéprimées humanisées avec des PBMC que la production d'IFN- α par les pDCs permettait de contrôler l'infection par EBV (Lim *et al.*, 2007). Cette activation des pDCs est dépendante de TLR9 qui reconnaît les motifs CpG non-méthylés de l'ADN d'EBV et permet ensuite l'activation spécifique des cellules NK et des lymphocytes T. D'autres études ont confirmé que l'activation des pDCs était médiée par le TLR9 amenant à une production d'IFN- α (Fiola *et al.*, 2010; Severa *et al.*, 2013). De même, il a été décrit que les ARN EBER pouvaient stimuler les pDCs *via* le TLR7 induisant également une production d'IFN- α qui peut être inhibé lors d'ajout d'inhibiteur du TLR7 (Quan *et al.*, 2010). De plus, *in vitro* les DCs dérivées de monocytes (mo-DCs) sont également capables de reconnaître EBV, d'activer une réponse des LT régulant la transformation des cellules B EBV+ (Bickham *et al.*, 2003). Cette activation des mo-DCs se fait *via* les TLR2 et TLR3. Néanmoins, seule la reconnaissance par le TLR3 permet une maturation complète des DC (Iwakiri *et al.*, 2009) alors que la stimulation des monocytes par le TLR2 induit une production de la chimiokine MCP1 et de la cytokine immunosuppressive IL-10 (Fiola *et al.*, 2010). De plus, les mo-DC peuvent cross-présenter des fragments antigéniques de cellules B infectées par EBV aux LT CD4+ et CD8+ permettant leur activation (Münz *et al.*, 2000; Subklewe *et al.*, 2001). De même, une fois activées, les DC vont recruter d'autres cellules immunitaires comme les granulocytes ou les cellules NK (**Figure 10**) qui pourront inhiber la transformation des cellules B et cibler les cellules en réplication lytique (Pappworth, Wang and Rowe, 2007; Chijioke, Müller, *et al.*, 2013).

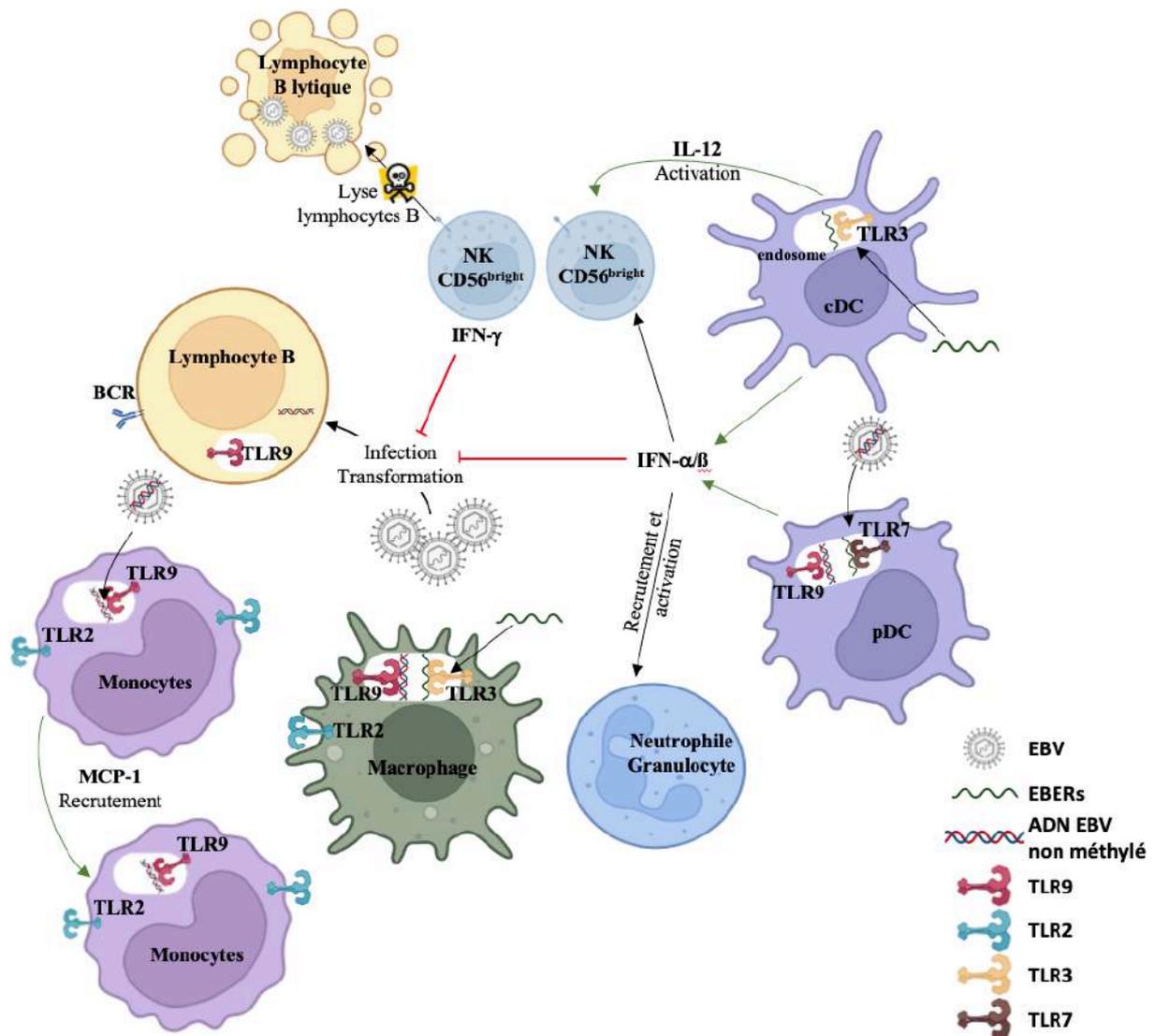


Figure 10 : Reconnaissance et réponse immunitaire innée contre EBV réalisée par (Anthony LEFEBVRE) sur Biorender (<https://www.biorender.com/>) inspirée de (Chijioke, Azzi, *et al.*, 2013; Lünemann, Rowe and Nadal, 2015). Les DC conventionnelles (cDCs) reconnaissent l'ARN EBER par le TLR3 permettant leur activation menant à la production d'IL-12 activateur des cellules NK CD56^{bright} et à la production d'IFN- α/β inhibant directement l'infection et la transformation des cellules B dans les premières 24h. Les DC plasmacytoïdes (pDCs) vont pouvoir détecter les ARN EBER *via* le TLR7 et l'ADN non méthylé d'EBV *via* le TLR9. Cette activation des pDCs mène à la production d'IFN- α/β qui permet le recrutement des cellules NK, des granulocytes et des neutrophiles. Le rôle des granulocytes et des neutrophiles n'est pas encore bien déterminé pour le moment. Les macrophages peuvent détecter EBV *via* les TLR2, TLR3 et TLR9 permettant *in vitro* la production de différentes cytokines notamment IL-6, IL-8, IL-10. Leur rôle reste néanmoins à déterminer. Les monocytes détectent l'ADN non méthylé d'EBV par le TLR9. *In vitro*, ces monocytes vont pouvoir recruter d'autres monocytes par la production de la chimiokine MCP-1 (CCL2). Enfin, les cellules NK inhibent la transformation des cellules B *via* la production d'IFN- γ et ciblent efficacement les cellules B en répllication lytiques (Chijioke, Azzi, *et al.*, 2013; Lünemann, Rowe and Nadal, 2015).

2. Réponse immunitaire adaptative contre EBV

La réponse immunitaire adaptative est nécessaire pour une immunité anti-EBV totalement efficace. Ceci est observable notamment chez les personnes atteintes de défauts dans le développement et la fonction des cellules T et qui développent des pathologies liées à EBV (Palendira and Rickinson, 2015; Picard *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2015). Une fois la réponse immunitaire innée mise en place, les cellules présentatrices d'antigènes vont pouvoir présenter les antigène d'EBV pour activer la réponse adaptative.

Lymphocytes T CD8

L'infection primaire par EBV chez les patients atteints d'MI s'accompagne d'une augmentation importante du nombre de LT CD8⁺ dans le sang, de l'ordre de 10 fois plus en comparaison avec des individus asymptomatiques (Callan *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2015). Chez ces patients, la majorité des LT CD8⁺ sont spécifiques des antigènes (Ag) lytique, avec 50% des LT CD8⁺ totaux répondant à des réponses dirigées contre des épitopes spécifiques alors que les réponses aux Ag de latence sont 10 fois moins importantes (Callan *et al.*, 2000; Leen *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2015). En lien avec cette augmentation de LT CD8⁺ activés, d'importante quantité de cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives (IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-10 et TGF- β) sériques sont retrouvées (Callan *et al.*, 2000; Panikkar *et al.*, 2015). En comparaison, chez les patients asymptomatiques les LT CD8⁺ spécifique d'EBV comptent pour 15% des CD8⁺ totaux, et représente 2 à 5% des LT CD8 mémoire (Hislop, Taylor, *et al.*, 2007).

Chez les individus atteints d'MI les réponses contre les épitopes latent d'EBV sont très faibles, représentant 5% des cellules T CD8⁺ (Hislop *et al.*, 2005). Ce sont les épitopes EBNA3A/B/C qui génèrent la plus grande réponse CD8⁺, alors que les réponses dirigées contre les épitopes EBNA1, EBNA2, LMP1 et LMP2 sont moins fréquentes (Taylor *et al.*, 2015). En effet, la protéine EBNA1 présente une région Gly-Ala qui limite la présentation des séquences en cis des LT CD8⁺ (Apcher *et al.*, 2009, 2010; Tellam *et al.*, 2012; Murat *et al.*, 2014), de faibles réponses contre les épitopes EBNA1 sont détectées chez les patients MI (Blake *et al.*, 2000).

Lymphocytes T CD4

Contrairement aux LT CD8⁺, le nombre de LT CD4⁺ dans le sang n'augmente pas (Balfour, Odumade, *et al.*, 2013; Sulik *et al.*, 2014). Néanmoins, des salves d'activation des LT CD4⁺ spécifiques d'EBV sont détectables (Amyes *et al.*, 2003; Precopio *et al.*, 2003). Lors de

l'infection primaire, les LT CD4⁺ spécifiques d'EBV sont amplifiés avec une réponse épitope atteignant 1% des LT CD4⁺ périphériques (Miyawaki *et al.*, 1991; Long *et al.*, 2013) et diminue à 0,1% à l'issue de l'infection (Amyes *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2013). La réponse des LT CD4⁺ se distingue de celle des LT CD8⁺ puisque les réponses spécifiques des antigènes latents sont plus nombreuses que celles contre les antigènes lytiques. Contrairement aux CD8, la réponse des LT CD4⁺ est plus générale et ne suit pas la hiérarchie de l'immunodominance. En effet, les LT CD4⁺ répondent aux protéines lytiques présentes dans toutes les phases du cycle (Long *et al.*, 2011; Ning *et al.*, 2011; Mautner and Bornkamm, 2012). Cette capacité de réponse va de pair avec la capacité des DCs et des LB à capturer et présenter ces antigènes viraux pour ensuite activer la réponse lymphocytaire T (Long *et al.*, 2011; Leung *et al.*, 2013). En ce sens, Münz et ses collaborateurs, ont mis en évidence que la réponse LT CD4⁺ pouvait amener à une production d'IFN- γ et à la cytolysse après avoir été mis en contact avec des lignées cellulaires de lymphomes B (B-LCLs). De plus, les lignées cellulaires de lymphomes B ou de lymphomes de Burkitt peuvent présenter EBNA1 après un processus endogène et Münz *et al.* suggèrent alors qu'*in vivo* la réponse immunitaire est initiée par les DCs qui présentent les cellules B infectées par EBV et que l'immunité des LT CD4⁺ spécifique d'EBV est renforcée pour traiter les tumeurs associées à EBV (Münz *et al.*, 2000).

Les LT CD4⁺ peuvent également avoir une fonction cytotoxique. *In vitro*, les LT CD4⁺ spécifiques d'EBNA1/2/3 sont capables de tuer des LCL autologues. Cet effet cytotoxique est médié par la libération de granzymes B (Moralès *et al.*, 2012). En plus d'une libération possible des granzymes B, il a été montré l'implication de la voie Fas/Fas ligand (Nikiforow *et al.*, 2003). Une fois établie dans le pool de cellules T mémoire, les LT CD4⁺ spécifiques d'EBV sont maintenues pour pouvoir réactiver rapidement une réponse immunitaire efficace lors de futures réactivation d'EBV (Ning *et al.*, 2011; Cárdenas Sierra *et al.*, 2014).

Lymphocytes B

Lors de l'infection par EBV, la réponse humorale se met en place en réponse à la réplication du virus. Cette réponse humorale est assurée par la production d'anticorps par les LB. Pour cela, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes producteurs d'anticorps et en lymphocytes B mémoire. Durant la phase lytique chez les patients atteints de LI sont détectées précocement des d'IgM anti-VCA ainsi que des quantités croissantes d'IgG anti-VCA qui se stabilise pour persister toute la vie (Henle *et al.*, 1979). Les IgG vont se fixer sur les cellules infectées et les rendre sensible à la lyse par cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendant (ADCC).

Contrairement aux IgM ou au IgG anti-VCA les anticorps contre les protéines de latence apparaissent plus tardivement (Meij *et al.*, 1999).

f) Échappement immunitaire d'EBV

Bien qu'EBV déclenche une réponse immunitaire lors de la primo infection, ce dernier persiste tout le long de la vie de l'hôte. Durant cette persistance, il alterne phase latente et phase lytique pour survivre et continuer son infection. Cette persistance laisse supposer qu'EBV met en place des mécanismes de régulation du système immunitaire de son hôte afin d'y échapper. Différentes études ont pu mettre en lumière les mécanismes d'échappement d'EBV.

1. Échappement durant la phase lytique d'EBV

Durant la phase lytique d'EBV différentes protéines vont être exprimé et pourront interférer avec la mise en place de la réponse immunitaire anti-virale. Ainsi, EBV peut inhiber la synthèse protéique des cellules infectées en déstabilisant les ARNm (Zuo *et al.*, 2008). Cette dégradation affecte des protéines immunitaires telles que les TLR2 et TLR9 servant à la détection d'EBV (Gaudreault *et al.*, 2007; van Gent *et al.*, 2011, 2015). En plus de la dérégulation des TLR, plusieurs protéines lytiques d'EBV perturbent la signalisation IRF, facteur de transcription induisant la production de l'IFN de type I. Hahn *et al.* ont décrit que la protéine BZLF1 interagissait avec IRF7 menant à l'inhibition de son activité transcriptionnelle sur IFN- α et IFN- β (Hahn *et al.*, 2005). Une autre protéine transactivatrice d'EBV BRLF1 réduit l'expression à la fois d'IRF3 et d'IRF7 inhibant la production d'IFN- β (Bentz *et al.*, 2010). D'autres protéines d'EBV comme la protéine du tégument LF2 ciblant IRF7 supprimant la production de l'IFN- α (Wu *et al.*, 2009) ou la protéine kinase BGLF4 inhibant l'activité transcriptionnelle d'IRF3 réduisant la réponse NF-kB induite par TLR3 (Wang *et al.*, 2009) interviennent dans l'échappement d'EBV. EBV est également capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de NF-kB se protégeant ainsi de la réponse anti-virale (Gutsch *et al.*, 1994; Dreyfus *et al.*, 1999; Morrison and Kenney, 2004). De plus, les protéines lytiques peuvent également perturber la fonction des molécules effectrices de l'immunité innée. La protéine BARTF1 neutralise les effets de la cytokine CSF-1 (colony-stimulating factor 1) réduisant la production d'IFN- α (Strockbine *et al.*, 1998; Cohen and Lekstrom, 1999). Parallèlement, BZLF1, dérégule les récepteurs du TNF- α et de l'IFN- α , inhibe la voie JAK/STAT (Michaud *et al.*, 2010) et induit la production de TGF- β (Cayrol and Flemington, 1995). Enfin, par les

biais des dUTPase, EBV peut activer la voie NF-kB (Waldman *et al.*, 2008; Ariza *et al.*, 2009) tout en inhibant la réponse antivirale des LT (Brooks *et al.*, 2006; Glaser *et al.*, 2006).

Afin d'empêcher la reconnaissance des cellules infectées par les cellules T spécifiques d'EBV, le virus interfère avec la présentation antigénique en dérégulant l'expression de l'HLA de classe I à la surface des cellules. Pour cela EBV induit l'expression de protéines permettant la dégradation des ARNm de l'HLA-I (Rowe *et al.*, 2007), la perturbation du chargement du peptide antigénique sur les molécules d'HLA-I (Hislop, Rensing, *et al.*, 2007; Horst *et al.*, 2009) et un renouvellement plus rapide au niveau de la membrane plasmique et par une augmentation de sa dégradation par les protéases des lysosomes (Zuo *et al.*, 2009). EBV met également en place des mécanismes pour échapper à la présentation par le HLA-II. Par le biais de différentes protéines, EBV bloque les interactions entre le récepteur des cellules T (TCR) et l'HLA II inhibant l'activation des LT CD4⁺ (Rensing *et al.*, 2003) et dégrade les ARNm des molécules HLA-II diminuant leur présence à la membrane (Rowe *et al.*, 2007). Enfin, EBV code une IL-10 virale qui inhibe les molécules de costimulation des monocytes humains (Salek-Ardakani, Arrand and Mackett, 2002) résultant en une mauvaise activation et expansion des LT CD4⁺ (Brooks *et al.*, 2006).

2. Échappement pendant la phase de latence d'EBV

Durant la phase de latence, EBV est moins visible pour le système immunitaire. Un profil d'expression des protéines de latence est associé à chaque type de latence ainsi que diverses pathologies malignes. La persistance d'EBV ainsi que le développement de ces pathologies sont liés à la capacité des différentes protéines de latence d'EBV de contrer la réponse immunitaire.

EBNA1

L'un des premiers mécanismes d'échappement d'EBNA1 réside dans sa structure. En effet, il contient un motif Glycine-Alanine répété qui inhibe la traduction et la dégradation d'EBNA1 par le protéasome (Levitskaya *et al.*, 1995). Cette stratégie assure un niveau suffisant d'EBNA1 pour permettre le maintien du génome viral tout en minimisant la présentation des antigènes viraux aux LT CD8⁺ (Hochberg *et al.*, 2004). Une autre capacité d'évasion immunitaire d'EBNA1 réside dans l'inhibition de la voie canonique NF-kB en interférant avec la phosphorylation du complexe IKK (Valentine *et al.*, 2010) et en modulant la voie de signalisation STAT1 et TGF- β (Wood *et al.*, 2007).

LMP1

LMP1 possède de multiples rôles dans l'échappement à la réponse immunitaire. LMP1 possède dans sa partie N-terminale une séquence peptidique immunosuppressive (LALLFWL) favorisant la production d'IL-10 tout en diminuant la production d'IL-12 et d'IL-2 par les cellules de LH inhibant la prolifération des cellules T (Dukers *et al.*, 2000). De plus, LMP1 est un mimétique de CD40 et en ce sens induit la prolifération et la croissance des cellules B en mimant la signalisation du CD40. Ceci mène à l'activation des voies NF-kB, JNK, MAPK, JAK-STAT et PI3K (Wang and Ning, 2021) permettant à LMP1 de diriger la réponse immunitaire de l'hôte (Middeldorp and Pegtel, 2008). LMP1 active la voie NF-kB dans les cellules B immortalisées activant la production de l'IFN de type I ce qui stimule l'expression de STAT1 (Najjar *et al.*, 2005, 2005; Xu, Brumm and Zhang, 2006). De plus, cette activation d'NF-kB réduit l'expression membranaire de TLR9 réduisant la détection des cellules infectées par EBV (Izumi and Kieff, 1997; Cahir-McFarland *et al.*, 2000). LMP1 active la voie de signalisation JAK/STAT ce qui peut être avantageux pour EBV car l'induction des gènes stimulés par l'IFN empêche la surinfection d'EBV et favorise l'entrée en phase de latence dans laquelle le virus est moins détectable par le système immunitaire de l'hôte (Gires *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004). LMP1 induit une augmentation d'expression d'IRF7 ce qui favorise la croissance cellulaire. Parallèlement une modification inhibitrice d'épissage d'IRF7 est induite pour réprimer les effets néfastes sur le virus de la production d'IFN de type I (Zhang and Pagano, 2000; Zhao *et al.*, 2010). Enfin, LMP1 est capable d'induire l'expression des chimiokines CCL17 et CCL22 dans les cellules infectées par EBV, ce qui a pour conséquence de recruter des cellules CCR4+ dont des lymphocytes T régulateurs permettant aux cellules infectées par EBV d'échapper à la réponse immunitaire (Nakayama *et al.*, 2004; Takegawa *et al.*, 2008).

LMP2A/2B

Dans les lignées cellulaires de carcinome, LMP2A inhibe l'activité d'NF-kB, la production d'IL-6 et la voie de signalisation JAK/STAT (Stewart *et al.*, 2004). En revanche dans les cellules B, LMP2A induit l'activation de NF-kB ce qui permet de protéger les cellules B de l'apoptose grâce à l'augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans des modèles murins transgéniques (Swanson-Mungerson, Bultema and Longnecker, 2010). Enfin, LMP2A et LMP2B augmentent le renouvellement à la membrane des récepteurs à l'IFN ce qui diminue les capacités de réponse des cellules épithéliales à l'IFN- α et à l'IFN- γ (Shah *et al.*, 2009).

EBERs

Durant la latence d'EBV deux ARN EBER1 et EBER2 sont produits (Lerner *et al.*, 1981). Les transcrits EBERs lient la protéine kinase R (PKR) dépendante du double brin l'ARN *in vitro* et inhibent l'apoptose (Clarke *et al.*, 1991). De plus, les transcrits EBERs sont capables de protéger les cellules de Lymphome de Burkitt de l'apoptose induite par IFN- α (Nanbo *et al.*, 2002; Ruf *et al.*, 2005).

BART et miARN BART

EBV produits plusieurs miARNs afin de passer au travers de la réponse immunitaire de l'hôte. Pour cela les miARNs vont interférer avec les réseaux de signalisations des cytokines et des chimiokines et bloquer la présentation antigénique ainsi que les réponses des LT.

Tout d'abord les miARNs vont être capables de moduler la réponse immunitaire innée. En effet, il a été montré que le miR-BART6-3P peut inhiber la signalisation du récepteur RIG-1 et ainsi la réponse à l'IFN de type I en se liant à l'extrémité UTR 3' de l'ARNm de RIG-1 (Lu *et al.*, 2017). Nachmani *et al.* ont décrit que le miR-BART2-5p inhibe l'expression de MICB à la membrane des cellules protégeant ainsi les cellules infectées de la réponse des cellules NK (D *et al.*, 2009). Le miR-BART16 cible directement la protéine CREBBP (cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein) bloquant l'induction de la voie de signalisation de l'IFN de type I (Hooykaas *et al.*, 2017). Enfin, miR-BART15 est capable de limiter l'inflammation en ciblant l'inflammasome NLRP3 (Haneklaus *et al.*, 2012).

De plus, les miARNs d'EBV peuvent bloquer les voies cytokiniques. Une étude récente a montré que le MiR-BART6-3p contrôle l'expression du récepteur à l'IL-6 (Ambrosio *et al.*, 2014). De même, la production de l'IL-12 est supprimé par les miR-BART1, miR-BART2, miR-BART22 (Tagawa *et al.*, 2016) ce qui diminue l'activation des LT effecteurs. Enfin, les miR-BART20-5p et miR-BART8 sont décrits dans le lymphome nasal à cellules NK pour déréguler la voie IFN- γ /STAT1 (Huang and Lin, 2014).

Les miARNs d'EBV contrôlent également la présentation antigénique et les réponses anti-virales T CD4+. Il a été montré que la protéolyse lysosomale est régulée par EBV. En effet, les transcrits des endopeptidases lysosomale AEP (asparagine endopeptidase) et CTSB (cathepsine B) ainsi que la thiol réductase GILT (gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase) impliquées dans les processing des molécules du CMH II sont des cibles directes des miR-BART1, miR-BART2 et miR-BHRF1-2 (Tagawa *et al.*, 2016). De plus, l'élimination de ces transcrits par siARN dans les cellules B humaines réduit leur reconnaissance par les LT

CD4⁺ (Tagawa *et al.*, 2016) montrant l'importance de ces miARNs dans la régulation de la présentation antigénique et l'évasion des cellules infectées par EBV. De plus, les miARNs d'EBV peuvent limiter le niveau des molécules HLA II à la membrane des cellules limitant la présentation antigénique (Gurer *et al.*, 2008). En outre, miR-BART17 cible directement la sous unité TAP2 du transporteur peptidique impliqué dans la présentation des antigènes d'EBV (Albanese *et al.*, 2016). Les miARNs EBV contrôlent également l'expression de gènes impliqués dans la réponse T. Skalsky et ses collaborateurs ont rapporté que le miR-BART1-5p cible et inhibe les transcrits de l'antigène lymphocytaire 75 (LY75) qui est un récepteur intervenant dans la capture des antigènes extracellulaires et la présentation antigénique *via* les molécules du CMH aux LT CD4⁺ et aux LT CD8⁺ permettant aux cellules tumorales de persister (Skalsky *et al.*, 2012). Enfin, T-bet un régulateur clé de la voie Th1 intervenant dans le maintien de la réponse T CD8⁺ et la production de l'IFN- γ est inhibé par le miR-BART20-5p qui supprime en plus p53 dans les cellules de lymphome NK/T (Lin *et al.*, 2013).

Ainsi le virus d'EBV bien que déclenchant une réponse immunitaire lors de la primo-infection et des différentes réactivations possibles au cours de la vie de l'hôte, il arrive aisément à survivre grâce à une multitude de mécanismes permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte. Tous ces mécanismes participent activement au développement des différentes pathologies malignes associées à EBV y compris le carcinome du nasopharynx faisant l'objet de cette thèse.

g) Carcinome du nasopharynx et EBV

EBV est depuis longtemps classé comme facteur associé au développement du CNP (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012). Il a été mis en évidence des variants de séquence d'EBV modulant le potentiel oncogénique et favorisant le risque de CNP. En effet, une délétion de 30 pb ou une perte du site *XhoI* dans la protéine LMP1 est associée à une augmentation des CNP (da Costa, Marques-Silva and Moreli, 2015). De même, dans une étude menée dans le sud de la Chine, deux variants d'EBV dans le gène BALF2 sont significativement associés à un risque accru de CNP (Xu *et al.*, 2019). Ces deux variants ont une prévalence de 83% dans le sud de la Chine et sont détectés dans la salive ce qui pourrait fournir un outil de dépistage du CNP (Cui *et al.*, 2017).

En plus des variations de séquence d'EBV, des variations génétiques dans la réponse immunitaire anti-EBV de l'hôte affectent également le risque de CNP associé à EBV. Ceci est appuyé par la découverte d'une grande séropositivité IgA d'EBV chez les parents au premier

degré des cas de CNP et notamment ceux portant les variants génétiques conférant une susceptibilité accrue au CNP (Coghill *et al.*, 2018). De plus, il est observé dans les cas de CNP en comparaison à des contrôles une déficience de réponse des LT CD8 spécifiques de l'épitope EBNA1 présenté par le HLA de classe I (Fogg *et al.*, 2009). Plusieurs années avant le développement du CNP, les anticorps IgA contre l'antigène de la capsid virale, l'antigène précoce d'EBV ainsi que les anticorps dirigés contre la DNase spécifique d'EBV sont présents en grandes quantités (Chien *et al.*, 2001). C'est pourquoi ces anticorps ont longtemps été utilisés comme outils de dépistage du CNP dans les populations à risque (Zeng *et al.*, 1985).

Hormis EBV, d'autres agents infectieux dont le papillomavirus (Hørding *et al.*, 1994; Z. Lin *et al.*, 2014), le virus de l'hépatite B et C (Ye *et al.*, 2015; Mahale *et al.*, 2016) ont été étudiés pour leur possible lien avec le CNP, mais aucun lien n'a été mis en évidence. Néanmoins, l'incidence des CNP de type I à cellules squameuses et des CNP de type II et III non-kératinisant est multipliée par deux chez les individus atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), en accord avec ce qui est observé dans les autres pathologies tumorales associées à EBV (Shebl, Bhatia and Engels, 2010).

iii. Modèle de la pathogenèse du CNP

Un modèle de développement de la tumorigénèse du CNP a été proposé par Kwok-Wai Lo et ses collaborateurs (Kwok-Wai, Grace Tin-Yun and Ka-Fai, 2012) puis repris par Kenneth *et al* (Wong *et al.*, 2021) représenté dans la **Figure 11**. L'exposition à des carcinogènes environnementaux induit des lésions génétiques (délétions dans les chromosomes 3p et 9p) et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (CDKN2A et TGFBE2) qui prédispose à la fois pour une infection par EBV et pour la transformation des cellules épithéliales du nasopharynx. Dans les cellules épithéliales du nasopharynx, l'infection persistante par EBV, la présence du génome viral et l'expression des protéines et miARNs caractéristiques de la latence II d'EBV (EBNA1, LMP1, LMP2, EBERS, miARNs BART) au fort potentiel oncogène, favorisent l'instabilité génomique induisant des méthylations de l'ADN et active les différentes marques caractéristiques du cancer (Hanahan, 2022). L'expansion clonale des cellules du nasopharynx transformées par EBV mène à l'accumulation de diverses modifications génétiques et épigénétiques induisant la progression du carcinome du nasopharynx. Les différentes altérations génétiques somatiques (mutation de la voie de signalisation NF-kB, modification des composants de présentation antigénique) ainsi que l'expression des gènes de latence d'EBV modulent également le microenvironnement tumoral et favorisent l'échappement immunitaire. Enfin, d'autres modifications génétiques comme l'altération de

TP53 ou des modifications de la voies PI3K-MAPK permettent la progression, les récides et l'établissement des métastases.

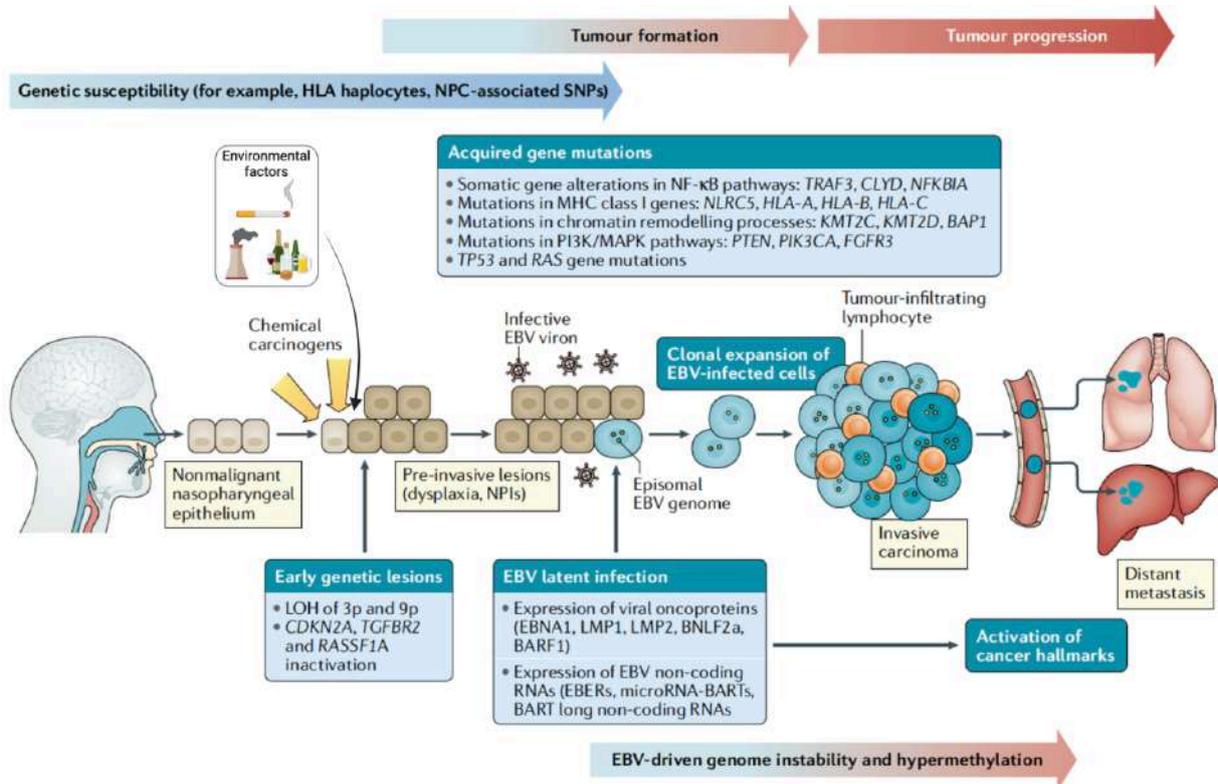


Figure 11 : Modèle de la tumorigénèse du carcinome du nasopharynx modifiée par (Anthony Lefebvre) inspiré de (Kwok-Wai, Grace Tin-Yun and Ka-Fai, 2012; Wong *et al.*, 2021). HLA, human leukocyte antigen; LOH, loss of heterozygosity; MHC, major histocompatibility complex; NPI, nasopharyngeal inlet; SNP, small nucleotide polymorphism.

D. Prises en charge des CNP

i. Traitements conventionnels

a) Chirurgie

Du fait de sa localisation profonde, la chirurgie du CNP n'est généralement pas envisagée. Cependant, la nasopharyngectomie est un traitement possible pour les CNP récurrents localisés. Récemment, des avancées ont été faites dans le développement de techniques chirurgicales moins invasives. La nasopharyngectomie endoscopique (ENPG) a notamment été testée dans des stades précoces et récurrents et montre de bons résultats avec une survie globale à 2 ans de 64,5% et à 5 ans de 38,3% (Liu *et al.*, 2017). Cette intervention a également été utilisée dans des stades tardifs récurrents T1 à T3 avec une efficacité plus

importante que la radiothérapie avec modulation d'intensité (IMRT) avec une survie globale à 5 ans respective de 77,1% et 55,5% (You *et al.*, 2015). De plus, d'autres méthodes utilisant de la robotique pour les nasopharyngectomies ont été développées comme le système Vinci S (Intuitive Surgical Inc., Sunnyvale, CA, USA) (Tsang *et al.*, 2015) et système Flex® (Medrobotics, Raynham, MA, USA) (Richmon, 2015). Bien que ces nouvelles approches chirurgicales offrent de nouvelles options pour la prise en charge des CNP, des effets secondaires impactant la qualité de vie des patients existent et c'est pourquoi la radiothérapie et/ou la chimiothérapie sont utilisées en première ligne.

b) Radiothérapie

Le CNP est très sensible aux radiations ionisantes, c'est pourquoi la radiothérapie est le traitement principal pour les CNP non métastatiques. Le traitement par radiothérapie a connu des progrès passant de la radiothérapie conventionnelle à deux dimensions à la radiothérapie à trois dimensions puis à l'IMRT (Chen *et al.*, 2019). L'IMRT est la technique la plus utilisée actuellement et a permis de réduire à 74 % les taux d'échec à 5 ans des CNP locorégionaux non métastatiques (Mao *et al.*, 2016). En plus des radiothérapies par modulation d'intensité, la proton thérapie ainsi que la thérapie par l'ion carbone sont de grand intérêt dans les CNP. En effet, ces techniques permettent de délivrer une dose de rayonnement thérapeutique élevée dans la région tumorale en épargnant au mieux les tissus normaux (Kong *et al.*, 2016; Lewis *et al.*, 2016). Dans une étude, la proton thérapie a permis de diminuer les doses de radiations des tissus normaux ainsi que d'obtenir une survie globale à 2 ans de 88,9% (Lewis *et al.*, 2016). De même, la thérapie par l'ion carbone a démontré dans une étude incluant 75 patients avec des CNP localement récurrents une survie globale d'1 an de 98,1% et une survie sans récurrence locale de 97,9% (J. Hu *et al.*, 2018). De plus larges études sont nécessaires pour fournir plus d'information pour l'utilisation de ces thérapies pour le traitement des CNP.

c) Chimiothérapie

Tandis que les stades précoces de CNP sont traités principalement par radiothérapie, les pathologies localement avancées nécessitent un traitement supplémentaire. La chimiothérapie couplée à la radiothérapie est nécessaire pour le traitement des CNP de stade avancés localisés. Actuellement, les directives du National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recommandent l'utilisation à la fois de la chimiothérapie concomitante avec une chimiothérapie adjuvante ou une chimiothérapie d'induction suivie d'une radiothérapie concomitante pour les

CNP de stade II et IVa (Colevas *et al.*, 2018). Une étude a d'ailleurs montré une meilleure survie globale suite à une chimiothérapie concomitante plus adjuvante ou une chimiothérapie concomitante en comparaison à une chimiothérapie adjuvante ou d'induction seule (Blanchard *et al.*, 2015). En revanche, l'association d'une chimiothérapie concomitante et adjuvante ne permet pas d'obtenir de meilleurs résultats qu'une chimiothérapie concomitante seule (L. Chen *et al.*, 2017).

La chimiothérapie concomitante est le traitement de référence dans le CNP localisé à des stades avancés. Elle repose sur l'administration de cisplatine comme premier choix à des doses allant de 40 mg/m² une fois par semaine ou de 80 à 100 mg/m² toutes les 3 semaines en pratique clinique (Chen *et al.*, 2019). Par ailleurs, un essai clinique de phase 3 est en cours pour évaluer la comparaison d'une radiothérapie seule contre une chimiothérapie concomitante dans les stades II et T3N0M0 de CNP (NCT02633202).

La chimiothérapie adjuvante consiste généralement en l'administration de cisplatine en association avec du fluorouracil (5-FU) ou de la gemcitabine toutes les 4 semaines pendant 3 cycles. La chimiothérapie adjuvante seule ne permet pas d'obtenir plus de survie globale et son supplément suite à une chimiothérapie concomitante n'apporte pas plus de bénéfices dans les cas de CNP locaux avancés. En outre, l'utilisation métronomique d'agents chimiothérapeutiques oraux comme l'ascapécitabine ou l'uracile plus le tegafur (prodrogue du 5-FU) en chimiothérapie adjuvante pourrait être une alternative après une chimiothérapie concomitante. La chimiothérapie métronomique correspond à l'administration régulière d'un médicament de chimiothérapie à des doses non toxiques sur un temps prolongés (Bocci and Kerbel, 2016). Cette pratique a montré divers effets anti-angiogénique, d'induction de la dormance tumorale et de l'activation de la réponse immunitaire pouvant se montrer intéressant dans les tumeurs associées à une immunosuppression (Bocci and Kerbel, 2016; Chen, Chang and Cheng, 2017).

Enfin, la chimiothérapie d'induction est mieux tolérée que celle adjuvante et permet une meilleure élimination des micrométastases. Différentes études ont pu montrer une amélioration de la survie sans progression, de la survie sans maladie et de la survie globale (Frikha *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019) dans les CNP localisés et avancés. Ainsi, la chimiothérapie d'induction tient une place importante dans le contrôle des CNP localisés avancés et améliore le contrôle des métastases à distance et par conséquent la survie des patients à haut risques métastatiques.

Le CNP est une tumeur très sensible aux radiothérapies et chimiothérapies. Ainsi l'application de la radiothérapie avec modulation d'intensité en association ou non à de la

chimiothérapie permet d'améliorer la prise en charge des patients atteints de CNP. Lorsqu'ils sont diagnostiqués à des stades précoces (stade I ou II) la survie globale à 5 ans est de 94% (Su *et al.*, 2022). Néanmoins, lorsque les patients sont diagnostiqués tardivement (stade III-IV), la survie à 5 ans est inférieure à 80% (Su *et al.*, 2022) et le risque de mortalité des patients en stade IV est 3,4 fois supérieur en comparaison à ceux diagnostiqués précocement (Siti-Azrin, Norsa'adah and Naing, 2017). C'est pourquoi le développement de nouvelles thérapies comme les immunothérapies ainsi que le développement de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic du CNP sont nécessaires afin de réduire la mortalité et augmenter la qualité de vie des patients.

ii. Immunothérapies dans le CNP

Du fait de l'important infiltrat immunitaire présent dans le CNP, celui-ci est un bon candidat pour les traitements par immunothérapie. Dans le CNP les immunothérapies peuvent être classées en deux groupes, les stratégies ciblant directement EBV et les stratégies ciblant les défenses immunitaires de l'hôte (Jain, Chia and Toh, 2016).

a) Immunothérapies ciblant directement EBV

Les stratégies ciblant EBV reposent principalement sur de la vaccination spécifique contre des épitopes d'EBV ainsi que sur le transfert de LT cytotoxiques (LTC) autologues, de CTL allogénique spécifiques d'antigènes tumoraux associés à EBV ou le transfert de DC autologue notamment induite par des agonistes du CD137L et chargées avec des peptides EBV (CD137L- DC-EBV-VAX) (Nickles *et al.*, 2022). Dans le contexte du CNP, EBV est en latence II et exprime les protéines associées à cette latence. Des stratégies de vaccination peptidiques ont été étudiées à partir de peptides antigéniques dérivés des protéines de latence II ayant une haute affinité pour les molécules du CMH II (Moralès *et al.*, 2012). Les premières immunothérapies ciblant EBV se concentraient principalement sur de la vaccination contre les protéines de latence II d'EBV (EBNA1, LMP1 et LMP2) ou sur le transfert de LTC autologue activés préalablement *ex vivo* (Comoli *et al.*, 2004, 2005; Hui *et al.*, 2013; Lutzky *et al.*, 2014; J. Huang *et al.*, 2017). Néanmoins, différentes résistances sont apparues comme l'augmentation de la fréquence des MDSCs ou des cytokines immunosuppressives CCL2 et CXCL10. Hopkins *et al.* ont montré que les chimiothérapies par la gemcitabine ou le carboplatine pouvait atténuer les résistances liées à l'expansion des MDSCs à la production de cytokines pro-inflammatoires ou à la déplétion des checkpoints immunitaires (Hopkins *et al.*, 2021). En ce sens, un essai

clinique de phase II combinant une chimiothérapie à une immunothérapie à base de CTL spécifiques d'EBV en première ligne chez des patients atteints de CNP récurrents ou métastatiques a menée à une survie globale à 2 ans de 62,9% (Chia *et al.*, 2014).

D'autre part, l'immunothérapie active ou les vaccins anti-tumoraux visent à améliorer la reconnaissance par le système immunitaire en délivrant des antigènes spécifiques de la tumeur par le biais de cellules présentatrices d'antigènes ou de vecteurs viraux. Yi et ses collaborateurs ont étudié l'injection de DC autologues exprimant la protéine de latence LMP2 dans le traitement du CNP (Zeng *et al.*, 2020) permettant de favoriser la réponse T spécifiques contre LMP2. Taylor *et al.* ont de leur côté développé un vaccin modifié à partir d'une souche inactive de la vaccine (Ankara) contenant la protéine LMP2 et la moitié de la partie C-terminale d'EBNA1 (MVA-EL) (Taylor *et al.*, 2014). Ces deux méthodes ont montré une bonne tolérance chez les patients. Plus récemment, Nickles *et al.* ont étudié l'injection de DC autologue induites par des agonistes CD137L chargées avec des peptides d'EBV (CD137L- DC-EBV-VAX) (Nickles *et al.*, 2022) avec une bonne tolérance chez les patients et une induction de la réponse CD8 et la présence de LT mémoire chez les répondeurs. A ce jour, seule l'injection de LTC autologues spécifiques d'EBV a pu atteindre la phase III avec l'essai clinique VANCE (NCT02578641) comparant l'utilisation de platine-gemcitabine avec ou sans LTC spécifiques d'EBV en première ligne de traitement des CNP récurrents et/ou métastatiques (**Tableau 3**).

b) Immunothérapies ciblant les défenses immunitaires

Plusieurs approches sont utilisées pour contrer le phénotype épuisé des cellules immunitaires, responsables de leur inefficacité à éliminer les cellules tumorales (Renaud *et al.*, 2020). Ces dernières consistent en l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou bispécifiques contre les points de rétrocontrôle immunitaires, d'anticorps conjugués à des médicaments ainsi que des thérapies utilisant des cellules génétiquement modifiées comme les CAR-T cell ou les cellules NK autologues (NCT02507154). L'axe PD-1/PD-L1 est considéré comme une bonne cible thérapeutique pour restaurer les fonctions anti-tumorales des cellules T. PD-1 est codée par le gène PDCD1 et est présent à la surface des cellules T tandis que PD-L1 est présent à la surface des cellules tumorales et d'autres cellules immunitaires dont les cellules dendritiques. De plus, PD-L1 est surexprimé dans le CNP ce qui est associée à un mauvais pronostic (Zhou *et al.*, 2017). Il a par ailleurs été rapporté que les LT CD8 infiltrant la tumeur expriment de façon importante PD-1 ce qui est associé à un mauvais pronostic dans le CNP (M.-C. Hsu *et al.*, 2010; J. Zhang *et al.*, 2015). En plus de l'axe PD-1/PD-L1, le checkpoint immunitaire

CTLA-4 (cytotoxic lymphocyte associated protein 4) est également associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CNP (P.-Y. Huang *et al.*, 2016). De même les points de contrôle immunitaire, TIM-3 et LAG-3 surexprimés en conjonction avec PD-1 sur les LT CD8 (Ott and Hodi, 2013) en cours d'activation sont d'intérêt dans le CNP. TIM3 inhibe la signalisation TCR *via* l'activation de la voie NF-kB. De plus, TIM-3 présent sur les LT effecteurs induit leur apoptose lorsqu'il se fixe à un de ces ligands la Gal-9, mais dans le cas des Treg, il accroît leur activité suppressive (Granier *et al.*, 2018). LAG-3 est également un récepteur inhibiteur qui s'exprime sur les LT effecteurs et régulateurs. Sur les Treg, il va en augmenter l'activité suppressive alors que sur les LT CD4 et LT CD8, il va se lier au CHM empêchant la reconnaissance CMH/TCR-CD3 et ainsi empêcher l'activation des LT.

Les immunothérapies avec les anticorps anti-PD-1 tels que le nivolumab, le pembrolizumab, le cemiplimab et les anti-PD-L1 dont l'atezolizumab, l'avelumab et le duravulumab ont été impliqués dans le traitement de divers tumeurs (Hamanishi *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2019) et cause généralement moins d'effet secondaire que les chimiothérapies (Huang *et al.*, 2019; Lv *et al.*, 2019). En revanche, l'utilisation d'anti-PD1/PD-L1 en monothérapie est moins efficace qu'une combinaison avec une chimiothérapie. En effet, une étude de phase I a rapporté que l'utilisation du camrelizumab (anti-PD-1) permettait d'obtenir 34% de taux de réponse globale contre 91% de réponse pour sa combinaison avec une chimiothérapie à la gemcitabine (Lv *et al.*, 2019). De façon identique, Fang *et al.*, ont rapporté que les patients ayant suivi une monothérapie au camrelizumab après un traitement à l'ipilimumab répondaient beaucoup mieux que ceux traités uniquement avec l'anti-PD-1 (75% VS 30%) (Fang *et al.*, 2018) montrant l'intérêt des combinaison immunothérapies entre elles ou avec des chimiothérapies.

Actuellement, environ 60 essais cliniques testent ces différentes approches. La majeure partie des études se concentrent sur les anti-PD-1 ou anti-PD-L1 chez des personnes ne répondant plus aux traitements classiques ou sur des CNP récurrent et/ou métastatiques. De plus, ces études regardent également l'efficacité d'une association des anti-PD-1, anti-PD-L1 en combinaison avec des radiothérapies, chimiothérapies ou d'autres checkpoints immunitaires comme des anti-CTLA4 (NCT03097939 et NCT02834013), anti-IDO (indoléamine 2, 3-dioxygénase) ou anti-LAG3 (NCCT02460224) ou les anti-TIM-3 (NCT02817633 et NCT02608268) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Essais cliniques terminés ou en cours sur les immunothérapies dans le CNP réalisé par (Anthony LEFEBVRE) d'après (<https://clinicaltrials.gov>)

Cibles	Traitements testés	Conditions	Références	Phase
EBV	PBMCs spécifiques d'EBV	CNP récurrents et/ou métastatiques associés à EBV	NCT00431210	I
LMP2	LT avec TCR spécifique d'LMP2 sécrétant l'IL-12	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT04509726	I/II
LMP2	Peptide LMP2 d'EBV	CNP	NCT00078494	I/II
LMP1	CAR-T cell anti-LMP1	CNP EBV positif	NCT02980315	I/II
EBV	Tabelecleucel	Tumeurs EBV +	NCT002822495	I/II
EBV et PD-1	Tabelecleucel + Pembrolizumab	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT03769467	I/II
LMP1, LMP2, EBNA1	LT TCR-EBV (LMP1, LMP2, EBNA1)	CNP en progression ou en rechute	NCT03648697	II
EBV	CTL contre EBV + Chimiothérapie	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT00953420	II
EBV	Immunothérapie spécifique d'EBV à partir des PBMCs	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT00834093	II
EBV	CTL-EBV + chimiothérapie	CNP avancés	NCT02578641	III
PD-1	Toripalimab + Gemcitabine	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT04405622	I
PD-1	Toripalimab	Tumeurs solides avancées dont CNP	NCT03474640	I
PD-1	KFA115 +/- Tislelizumab	Tumeurs avancées dont CNP	NCT05544929	I
PD-1	Sintilimab + radiothérapie + chimiothérapie	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT05417139	II
PD-1	Sintilimab + radiothérapie multimodale	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT04917770	II
PD-1	Camrelizumab +Gemcitabine + Cisplatine puis IMRT	CNP métastatiques	NCT05431764	II
PD-1	Toripalimab adjuvant ou néo-adjuvant + chimiothérapie	CNP localisés à haut risque	NCT03925090	II
PD-1	Pembrolizumab	Patients avec ADN EBV dans le plasma sans maladie résiduelle	NCT03544099	II
PD-1	Tislelizumab + chimiothérapie	CNP localisé développé non opérable et récurrent	NCT04921995	II

PD-1	Toripalimab + chimiothérapie	CNP localisés récurrent	NCT04992988	II
PD-1	Nivolumab + chimioradiothérapie	CNP de stade II à IV B	NCT03267498	II
PD-1	Anti-PD-1 + Capecitabine	CNP métastatiques	NCT05290194	II
PD-1	Anti-PD-1 + chimiothérapie	CNP localisés avancés à haut risque	NCT04605562	II
PD-1	Tislelizumab + Chimiothérapie	CNP localisés avancés	NCT04833257	II
PD-1	Tisleilizumab + chimiothérapie	CNP localisés avancés (T4 N1 ou T1-4 N2-3)	NCT04870905	II
PD-1	Tirelizumab +/- chirurgie	CNP récurrents	NCT05092217	II
PD-1	Penpulimab + chimiothérapie ± chlorhydrate d'anlotinib	CNP avancés non traités	NCT04736810	II
PD-1	AK105	CNP métastatique	NCT03866967	II
PD-1	JS001 en combinaison	CNP métastatiques	NCT04890522	II/III
PD-1	Camrelizumab + radiothérapie	CNP métastatiques	NCT04944914	III
PD-1	Toripalimab + chimiothérapie	CNP récurrent	NCT05340491	III
PD-1	Toripalimab +/- chimiothérapie	CNP localisés récurrents	NCT04376866	III
PD-1	Nivolumab +/- chimiothérapies	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT04458909	III
PD-1 et CTLA4	IBI310 + Sintilimab	CNP récurrents et/ou métastatiques PD-1/PD-L1 résistants	NCT04945421	I/II
PD-1 et CTLA4	Nivolumab + Ipilimumab	Tumeurs solides rares dont CNP	NCT02834013	II
PD-1 / CTLA4	Cadonilimab (anticorps bispécifique)	CNP localisés avancés	NCT05587374	III
IKZF2 et PD1	DKY709 +/- PDR001	Tumeurs solides avancées dont CNP	NCT03891953	I
LT et PD-1	PEG-rhG-CSF + anti-PD-1	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT05222009	I
PD-1 et VEDF	Pembrolizumab +/-Bevacizumab	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT03813394	I/II
PD-1 et VEGF	Toripalimab + Bevacizumab + gemcitabine	CNP local avancé	NCT05341193	I/II
PD-1 et VEGFR	Camrelizumab + Apatinib	CNP récurrent et/ou métastatiques résistants aux anti-PD-1	NCT04548271	II
PD-1 et VEGFR	Camrelizumab + Apatinib	CNP récurrent et/ou métastatiques	NCT04547088	II
PD-1 et VEGFR	Camrelizumab + Apatinib	CNP récurrents et/ou métastatiques	NCT04586088	II

PD-L1	INCB099318	Tumeurs solides avancées dont CNP	NCT04272034	I
PD-L1	INCB099280	Tumeurs solides avancées dont CNP	NCT04242199	I
PD-L1 et IDO	Durvalumab et Epcadostat	CNP récurrent et/ou métastatique, stade III, IVA, IVB	NCT04231864	II
PD-L1 et VEGF	Atezolizumab + Bevacizumab	Tumeurs solides rares dont CNP	NCT03074513	II
PD-L1 VEGF	Atezolizumab +/- Bevacizumab +/- chimiothérapie	Stade IV de CNP	NCT05063552	II/III
TGF-β	LT cytotoxiques (CTL) résistant au TGF-β	CNP positif à EBV	NCT02065362	I
	Immunothérapie + Endoscopie transnasal	CNP récurrents	NCT05350891	II
LT	Lymphocytes T infiltrant la tumeur et réactivés + IL-2	CNP avancé	NCT01462903	I
LT	Transfert de Tγδ greffés avec des récepteurs d'antigènes chimériques NKG2DL	Tumeurs solides dont CNP	NCT04107142	I
LT	DC + CTL (DC-CTL) + cellules tueuses induites par cytokines	Tumeurs solides dont CNP	NCT03047525	I/II
LT	(CIK) + chimiothérapie	CNP métastatiques	NCT03007836	I/II
LT	Cellules NK à haute activités TIL + chimiothérapie	CNP localisés avancés à haut risque	NCT02421640	II
LT	DC-CIK	Cancers solides dont CNP	NCT04476641	II
LT	Gemcitabine + carboplatine + LT activés en laboratoire	CNP récurrents et positif à EBV	NCT00690872	II

E. Microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral du CNP est complexe et très hétérogène. Il se compose à la fois de composants cellulaires et acellulaires. Les composants cellulaires incluent les cellules endothéliales tumorales formant les réseaux de transports de l'oxygène et des nutriments, les fibroblastes associés au cancer (CAF) qui permettent la croissance, la survie, l'invasion et la migration et enfin les cellules immunitaires impliquées dans les différentes réactions présentes au sein du microenvironnement tumorale (TME). Les composants acellulaires incluent la matrice extracellulaire qui facilite le développement tumoral, la progression et les métastases (**Figure 12**). Dans tout ce microenvironnement tumoral, l'infiltrat immunitaire représente entre 40 et 50% de la masse tumorale, qui classe également le CNP parmi les lymphoépithéliomes (Chong *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1990; Gourzones, Barjon and Busson, 2012). Bien qu'abondant, il y a un défaut de réponse immunitaire qui s'explique par la présence de populations lymphoïdes et myéloïdes immunosuppressives telles que les Treg, les macrophages M2, les DC ou les MDSCs (Li *et al.*, 2015; Gong *et al.*, 2021; S. Cheng *et al.*, 2021). Tout l'infiltrat se divise en deux grands groupes les cellules lymphoïdes et les cellules myéloïdes infiltrant la tumeur.

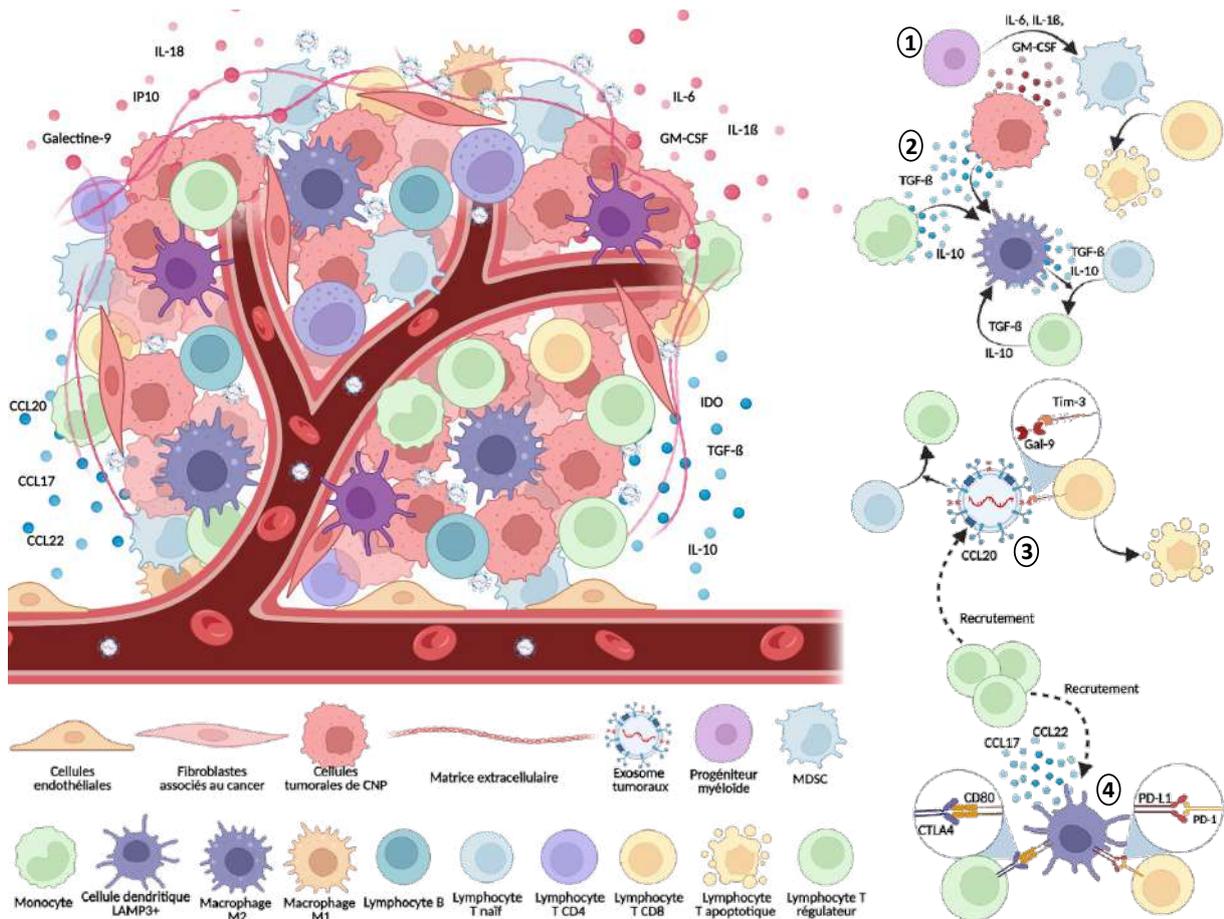


Figure 12: Microenvironnement tumoral du carcinome du nasopharynx réalisée par (Anthony Lefebvre) sur Biorender (<https://www.biorender.com/>). Cette figure illustre le microenvironnement immunitaire présent au sein des tumeurs de CNP et certaines interactions entre la tumeur et le système immunitaire favorisant l'immunosuppression. (1) Les cellules tumorales de CNP produisent différentes cytokines et facteurs de croissances comme l'IL-6, l'IL-1β ou le GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) permettant notamment la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes en MDSCs. Ces MDSCs ont un rôle direct dans l'immunorégulation en induisant l'apoptose des LT CD8. (2) Parallèlement, les cellules de CNP et les monocytes produisent du TGF-β et de l'IL-10 (cytokines immunosuppressives) ce qui favorise notamment l'émergence des macrophages de type M2. Ces Macrophages M2 en retour induiront la différenciation des LT CD4 naïfs en Treg qui par une boucle paracrine produiront du TGF-β et de l'IL-10 favorisant le phénotype M2 des macrophages. (3) Les cellules de CNP libèrent dans le milieu extracellulaire des exosomes porteur de différentes protéines donc la galectine-9, LMP1 et la CCL20 qui permettent l'évasion immunitaire. La galectine-9 présente sur les exosomes se lie à TIM-3 sur les LT effecteur et provoque leur apoptose. La CCL20 intervient dans le recrutement des Treg au niveau tumoral qui pourront convertir les T naïfs et Treg. Concernant les DC, les DC LAMP3⁺ produisent les chimiokines CCL17 et CCL22 intervenant dans le recrutement des Treg. (4) Les DC LAMP3⁺ permettent à la fois l'expansion et la fonction suppressive des Treg *via* l'interaction CD80/CTLA4 ainsi que le phénotype épuisé des LT effecteurs *via* l'interaction PD-L1/PD-1.

i. Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)

Parmi les TILs, les lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB) sont les plus abondants dans le microenvironnement du CNP. Différentes populations de LT sont décrites, on y retrouve les LT naïfs, les LT cytotoxiques, les LT épuisés ainsi que les Treg (Chen *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020; Gong *et al.*, 2021). Les lymphocytes CD3⁺ comprenant à la fois les LT CD4⁺ helper et les LT CD8⁺ sont prédominants dans l'infiltrat immunitaire. Bien qu'ils présentent certains marqueurs d'activation comme OKT10, ces LT ont une restriction de l'expression des molécules HLA et du TCR contribuant à l'échappement de la tumeur au système immunitaire (Herait *et al.*, 1987; Chong *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1990; Chen, Chew and Chan, 1995). En ce sens, des études transcriptomiques ont mis en évidence que les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ étaient à la fois activés et épuisés puisqu'ils expriment différents marqueurs de l'épuisement (LAG3, TIGIT, PDCD1, CTLA4, HAVCR2, TOX) (Chen *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020; Gong *et al.*, 2021). Différents mécanismes intrinsèques et extrinsèques interviennent dans l'épuisement des LT. Parmi les mécanismes intrinsèques nous retrouvons l'expression des checkpoints immunitaires comme PD-1, CTLA-4, TIM-3 (T cell immunoglobulin and Mucin domain 3), LAG-3 (lymphocyte activation gene-3), BTLA et TIGIT, la diminution de production de cytokines activatrices comme l'IL-2, le TNF- α , IFN- γ et des facteurs de transcriptions comme NFATC1 (Nuclear Factor of Activated T Cells 1) nécessaire pour la différenciation des cellules T (Jiang, Li and Zhu, 2015; Chen *et al.*, 2020). Les mécanismes extrinsèques dépendent principalement de l'inhibition apportée par les Treg, les DC, les MDSC, de cytokines immunosuppressives comme le TGF- β ou l'IL-10 et de l'interaction avec le CMH de classe II exprimé par les cellules de CNP (Jiang, Li and Zhu, 2015; Jin *et al.*, 2020).

Les LB représentent la deuxième population la plus diversifiée dans le CNP. Les LB regroupent les LB mémoires, les LB du centre germinatif, et les plasmocytes. Miao *et al.* ont rapporté que le miR-21 dérivé du CNP induit des LB IL-10⁺ qui sont immunosuppresseurs. Inversement, il a été montré que les LB CD19⁺ corrélaient avec un bon pronostic chez les patients atteints d'un CNP EBV⁺ (Xu *et al.*, 2014). En ce sens, il a été observé une survie des patients atteints de CNP lors d'une expression plus élevée des gènes CD79A, MS4A1, IGHD et FCRL4 dans les cellules B (Gong *et al.*, 2021) laissant suggérer une réponse immunitaire anti-CNP par certaines cellules B infiltrant la tumeur.

Dans le contexte du CNP, il est décrit une diminution d'expression des récepteurs inhibiteurs à la surface des NK comme le récepteur NKG2D (NK group 2 member D), NKp30, NKp46 comme mécanismes d'échappement immunitaire (Xu *et al.*, 2018). De plus, l'expression du récepteur inhibiteur IL-18 induit l'expression de PD-1 sur les NK limitant

l'action anti-tumorale des cellules NK (Liou *et al.*, 2020). Plus récemment, Gong et ses collaborateurs, ont montré une expression de gènes et de chimiokines dans les cellules NK infiltrant la tumeur montrant une activité activatrice anti-tumorale contre le CNP (Gong *et al.*, 2021). Ainsi dans le CNP les populations de NK ne semblent pas diminuer par rapport aux donneurs sains, mais sont très peu fonctionnels ce qui ajoute un élément supplémentaire à l'immunosuppression gouvernant le microenvironnement tumoral du CNP (Png *et al.*, 2021).

ii. Les cellules myéloïdes infiltrant la tumeur (TIMs)

Les cellules myéloïdes infiltrant la tumeur regroupent différents types de cellules immunitaires telles que les monocytes, les macrophages, les MDSC et les DC. Les monocytes et les macrophages représentent 50% des cellules myéloïdes infiltrant la tumeur (Kim and Bae, 2016). Les macrophages sont des cellules immunitaires très plastiques et peuvent aisément en fonction des facteurs présents dans le microenvironnement changer entre un phénotype inflammatoire, on parle alors de macrophages de type M1, ou un phénotype immunosuppresseur pour les macrophages de type M2 (Hinshaw and Shevde, 2019). Dans le contexte du CNP, les cellules tumorales induisent la polarisation en macrophages M2 CD163⁺ *via* la production de TGF- β et d'IL-10 ce qui en retour permet l'attraction des Treg à travers la conversion des T naïfs par le TGF- β et l'IL-2. En retour, les Treg vont produire du TGF- β 1 et de l'IL-10 induisant la différenciation en macrophages M2 (Wang *et al.*, 2017). De façon intéressante une étude transcriptomique a récemment mis en évidence la co-expression des génotypes M1 et M2 dans les macrophages associés au CNP leur conférant une double fonction à la fois pro-inflammatoire et pro-tumorale (Jin *et al.*, 2020). Ainsi, par la production des chimiokines CXCL9 et CXCL10, les macrophages pourront recruter au site tumoral les cellules NK CXCR3⁺ et des LT CD8⁺ ayant la capacité de cibler la tumeur (Chen *et al.*, 2020). Inversement, les macrophages associés à la tumeur expriment la signature angiogénique SSP1 qui est associée à un mauvais pronostic dans les CNP (S. Cheng *et al.*, 2021). De plus, il a été démontré que le miR-18a dérivé des exosomes de macrophages M2 favorise la progression, l'invasion et la croissance tumoral du CNP à travers la voie du TGF- β réprimant le récepteur du facteur de croissance transformant beta III (TGF β R3) (Peng *et al.*, 2020).

Sous la présence de certains facteurs du microenvironnement tumoral, des altérations de la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes et des défauts de la myélopoïèse conduisent à l'accumulation des MDSCs. En effet dans le CNP, des modifications métaboliques notamment induites par la protéine LMP1 d'EBV provoquent la production d'IL-1 β , d'IL-6, de GM-CSF à travers la voie NLRP3 de l'inflammasome, de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et P-

p65. En retour, il y aura activation de la voie de signalisation STAT2 induisant une accumulation des MDSCs (Cai *et al.*, 2017; Groth *et al.*, 2019). Ces MDSCs jouent un rôle direct à la fois dans l'immunosuppression et la progression du CNP. En effet, ils sont capables d'inhiber la prolifération, de rendre anergique ou bien d'induire l'apoptose des LT (Groth *et al.*, 2019). De plus, les MDSCs favorisent la transition épithéliaux-mésenchymateuse *via* l'activation de la voie β -caténine/TCF4 et l'expression de COX-2 favorisant la migration, l'invasion et les métastases du CNP (Li *et al.*, 2015). En ce sens la présence de MDSCs HLA-DR⁻ CD33⁺ et COX-2 est synonyme de mauvais pronostic chez les patients atteints de CNP (Li *et al.*, 2015).

Les cellules dendritiques sont également retrouvées au sein de ce microenvironnement immunitaire. Les DC seront décrites plus en détail dans la partie III de cette introduction de thèse. Brièvement, les DC permettent la mise en place d'une réponse immunitaire antigène spécifique par la reconnaissance et la présentation des antigènes pathogènes aux cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires. Au sein de la tumeur, les DC peuvent à la fois exercer un rôle immunogène et régulateur. Les DC présentes dans le microenvironnement se divisent en deux sous-populations les DC plasmacytoïdes (pDCs) et les DC conventionnelles (cDCs). Les pDCs sont associées à un bon pronostic grâce à leur capacité d'induire une réponse anti-tumorale *via* l'expression importante des enzymes pro-apoptotiques GzmB (Granzyme B) (Chen *et al.*, 2020). *A contrario*, les cDCs et notamment la sous-population LAMP3⁺ cDCs représentent les DC régulatrices avec une faible capacité de présentation antigénique et de forte expression des gènes suppresseurs de l'immunité comme CD274 (PD-L1), PDCD1LG2 (PD-L2), IDO1 et CD200 (Liu *et al.*, 2021; S. Cheng *et al.*, 2021). Les cDCs LAMP3⁺ peuvent recruter les Treg périphériques à travers des interactions chimiokines/récepteurs comme les interactions CCL17/CCR4 ou CCL22/CCR4 (Liu *et al.*, 2021). De plus, les DC LAMP3⁺ ont un effet suppresseur sur les LT CD8⁺ *via* la signalisation CD200/CD200R et PD-L1/PD1 menant à un phénotype épuisé des LT CD8⁺ (Liu *et al.*, 2021). Parallèlement, les cDCs LAMP3⁺ et les Treg peuvent interagir au niveau de la liaison CTLA-4⁺ CD80/CD86 ce qui diminue la présentation antigénique des DCs et favorise la production d'IDO1, inhibiteur de l'activation des T effecteurs et inducteur de la prolifération des Treg (Liu *et al.*, 2021).

iii. La galectine-9

Les galectines sont une famille de lectines animales se liants aux β -galactosides. Elles exercent de multiples fonctions dans les cellules et peuvent également être sécrétées par des voies non conventionnelles indépendantes de la voie classique faisant intervenir le réseau

réticulum endoplasmique/Golgi (John and Mishra, 2016). Parmi toutes les galectines, la galectine-9 (Gal-9) est particulièrement intéressante dans le CNP. La Gal-9 appartient à la famille des « tandem repeat » codée par les gènes LGALS9, LGALS9B et LGALS9C donnant différents variants par épissage alternatif (isoformes) (Chabot *et al.*, 2002). Actuellement 3 isoformes principales sont décrites et diffèrent au niveau de la région peptidique qui relie les deux domaines de reconnaissance aux carbohydrates (CRD). Deux autres variants ont été identifiés avec une partie tronquée de la région C-terminale (Spitzenberger, Graessler and Schroeder, 2001; Chabot *et al.*, 2002).

Initialement, la galectine-9 a été décrite pour sa capacité à recruter les éosinophiles (Matsumoto *et al.*, 1998). Plus récemment, elle a été identifiée comme un modulateur polyvalent de la réponse immunitaire agissant sur un large panel de population immunitaire. La Gal-9 est connue depuis longtemps pour induire l'apoptose des LT effecteurs en se liant à TIM-3 (Gleason *et al.*, 2012), mais elle est également capable d'inhiber les cellules Th17 (Seki *et al.*, 2008), d'induire l'expansion des macrophages de type M2 (W. Zhang *et al.*, 2019), des Treg, des MDSCs (Seki *et al.*, 2008; C *et al.*, 2014) et d'induire la maturation des cellules dendritiques (John and Mishra, 2016), à travers les interactions avec ces récepteurs TIM-3 et CD44. De plus, la Gal-9 peut se retrouver à la surface de microvésicules extracellulaires produites par les cellules tumorales appelées exosomes. Il a été montré dans le contexte du glioblastome, que les exosomes Gal-9⁺ isolés à partir des fluides cérébrospinaux peuvent interagir avec TIM-3 présent à la surface des DC infiltrant la tumeur et inhiber la reconnaissance et la présentation antigénique menant à un défaut d'induction d'une réponse cytotoxique anti-tumorale (Ming *et al.*, 2020). La Gal-9 intracellulaire possède également un rôle dans le trafic intracellulaire, l'adhésion, la migration cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Zhu *et al.*, 2005; Bitra *et al.*, 2018; Jia *et al.*, 2019).

Cependant, outre les différents effets sur la régulation immunitaire, il a été montré des rôles très controversés de la Gal-9 à la fois bon et mauvais pronostic en fonction du type de cancer. L'expression de la Gal-9 est associée à un mauvais pronostic dans l'adénocarcinome pancréatique, les cancers rénaux et les leucémies myéloïdes aiguës (Jikuya *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Alors qu'elle est associée à de bons pronostics dans plusieurs cancers solides comme le cancer du côlon, l'hépatocarcinome ou les cancers gastrique (Fujita *et al.*, 2015; X. Zhou *et al.*, 2018; Morishita *et al.*, 2021). Concernant le CNP, l'expression de la Gal-9 est associée à un mauvais pronostic pour la survie des patients. En effet, la Gal-9 présente sur ces exosomes peut se lier à TIM-3 un récepteur présent notamment sur les LT activés⁺ et induire leur apoptose (Klibi *et al.*, 2009) et peut également favoriser l'activité suppressive des Treg

(Mustapha, 2016). De plus, la surexpression de la Gal-9 dans le CNP est associée à une expression importante de TIM-3 et de Foxp3 et une diminution de l'expression de CD8 dans les LT (T.-C. Chen *et al.*, 2017). Ainsi, dans le CNP, la Gal-9 est considérée comme un des contributeurs majeurs dans l'évasion immunitaire en inhibant certains mécanismes de la réponse anti-tumorale.

iv. Les lymphocytes T régulateurs

En plus des lymphocytes épuisés, sont retrouvés au sein du microenvironnement du CNP des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Huo *et al.*, 2020). Les Treg sont une population hétérogène regroupant plusieurs sous-populations. Classiquement il est décrit que les Treg se répartissent en deux grands groupes : les Treg naturelles (nTreg) et les Treg induits en périphérie (iTreg).

Les nTreg sont les Treg qui dérivent directement du thymus. Ils représentent la majorité des Treg FoxP3⁺ en périphérie et représentent 1 à 2% des cellules T circulantes. Contrairement aux nTreg, les iTreg ne sont pas générés dans le thymus. Les iTreg sont produits en périphérie à partir des LT naïfs ou à partir des LT mature en l'absence d'exposition à un antigène activateur. Différents éléments interviennent dans la génération des iTreg. Le microenvironnement cytokinique (notamment TGF- β), ainsi que la présence d'autres types cellulaires sont nécessaires à l'émergence des iTreg. Il a notamment été montré que les cellules dendritiques tolérogènes (tDC) permettaient la différenciation des iTreg notamment en présence de TGF- β et d'IL-2 (Kanamori *et al.*, 2016).

Les Treg exercent leurs effets suppresseurs de différentes manières à la fois par le biais de mécanismes directs ou indirects (Vignali, Collison and Workman, 2008). Ces mécanismes, impliquent les molécules de rétrocontrôles immunitaire ou checkpoint immunitaire comme PD-1 ou CTLA-4, la production de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β inhibant la prolifération des cellules effectrices. Outre l'inhibition de la prolifération, les Treg sont capables d'induire l'apoptose à travers la sécrétion d'enzymes Perforines et Granzymes B, mais également par des interactions ligand-récepteur Fas/FasL (Fas Ligand). Les Treg peuvent directement rentrer en contact avec les cellules T naïves et inhiber leur prolifération. De plus, il a été montré une modulation du métabolisme en faveur d'un métabolisme immunosuppresseur telle que l'induction de l'expression de l'enzyme IDO dans le microenvironnement tumoral (Ohue and Nishikawa, 2019). De façon intéressante, dans le contexte du CNP, les Treg expriment la galectine-1 (LGALS1) connue pour induire une immunorégulation *via* l'expression de PD-L1 et de la galectine-9 dans les cancers de la tête et

du cou (Nambiar *et al.*, 2019). Par ailleurs, notre équipe de recherche a montré que les exosomes dérivés de CNP portent la chimiokine CCL20 et sont capables d'exercer un effet chimioattracteur sur les Treg. Ces vésicules attirent les LT conventionnels (CD4⁺CD25⁻) pour les convertir en Treg (CD4⁺CD25^{high}) et favorisent ainsi la fonction suppressive et l'expansion des Treg humain participant activement à l'immunosuppression dans le CNP (Mrizak *et al.*, 2015).

De plus, les capacités immunorégulatrices des Treg sont utilisées à profit par EBV pour permettre son développement et sa persistance dans l'hôte et ainsi aider au développement du CNP et des pathologies associées. Il a été rapporté une expansion des Treg fonctionnels dans la périphérie mais également au niveau tumoral dans le CNP et le LH (Baráth *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2007). Chez les patients atteints de LH, EBNA1 induit l'expression de la chimiokine CCL20 dans les cellules de Reed-Sternberg ce qui a pour conséquence d'attirer les Treg au site tumoral (Baumforth *et al.*, 2008). Chez les patients atteints de MI, il est suggéré une diminution des Treg circulant, mais un maintien de ceux présents dans les amygdales (Wingate *et al.*, 2009). De plus, des taux plus importants d'IL-10 et de TGF- β ont été rapportés dans les plasmas de patients atteints d'MI (Wingate *et al.*, 2009). La production d'IL-10 a notamment été reliée à la présence de LMP1 qui par l'activation de la voie P38 et PI3K induit la production d'IL-10 (Lambert and Martinez, 2007).

Ainsi les Treg participent activement à l'immunosuppression dans le CNP de par leurs fonctions immunosuppressives développées, mais également grâce aux acteurs du microenvironnement notamment les exosomes tumoraux et les cellules dendritiques tolérogènes qui favorisent leur émergence.

III- Cellules Dendritiques

Les cellules dendritiques sont des acteurs pivots de la réponse immunitaire faisant le lien direct entre la réponse innée et adaptative permettant à la fois l'activation de la réponse immunitaire ou bien la tolérance. Initialement, elles ont été décrites par Steinman et ses collaborateurs chez la souris par leur aspect spécifique montrant des prolongement (dendrites) ainsi que leur capacité à activer les LT naïfs (Steinman and Cohn, 1973; Steinman, Adams and Cohn, 1975), ce qui leur a valu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2011. Les DC ont la capacité de capturer un antigène pathogène externe ou du soi afin de le présenter pour activer la réponse immunitaire T adéquate. Cette ambivalence entre activation et tolérance s'explique par la grande diversité des DC tant au niveau phénotypique que fonctionnelle. Afin de permettre cette fonctionnalité, il a été montré que les DC migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter les antigènes capturés aux LT naïfs (Austyn *et al.*, 1988). En plus des DC d'autres cellules peuvent présenter les antigènes comme les macrophages, les cellules B ou encore les cellules épithéliales, mais les DC sont celles qui le font le plus efficacement, notamment pour l'activation des T CD4⁺ naïves, et sont dès lors appelées cellules présentatrices professionnelles. Les DC humaines sont caractérisées par leur forte expression des molécules de présentation antigénique les CMH I et II ainsi que l'intégrine CD11c molécules également retrouvées dans d'autres populations immunitaires comme les monocytes, les lymphocytes et macrophages (Rubtsov *et al.*, 2011; Drutman, Kendall and Trombetta, 2012). Elles expriment d'autres marqueurs qui permettent leur classification en différents types de DC dont nous discuterons ensuite. De plus, elles migrent dans les organes lymphoïdes secondaires afin d'interagir avec les LT naïfs et de les activer *via* le processus de la synapse immunologique et la production de différentes cytokines (O'Keeffe, Mok and Radford, 2015).

A. Origine et classification des cellules dendritiques

i. Ontogénie

Encore aujourd'hui, il est difficile de classer les DC de façon fiable en raison de leur grande hétérogénéité. Classiquement les DC sont classées en fonction de leur ontogénie et de l'organe de résidence. Elles peuvent être classées en deux groupes, les DC résidentes dans les tissus lymphoïdes et les DC migratoire (Haniffa, Collin and Ginhoux, 2013). C'est chez la souris que les DC ont été identifiées en premier et depuis les différents travaux menés dans des modèles murins ont permis l'identification de différentes sous-populations qui ont pu ensuite être étendus et caractérisées chez l'humain (Mildner and Jung, 2014). Néanmoins, chez

l'humain toutes les sous-populations de DC ne sont pas encore bien identifiées s'expliquant par le fait que les différents travaux sont surtout réalisés à partir de cellules issues du sang ou de la peau. Plus récemment, une étude a caractérisé les sous-populations de DC humaines au sein des poumons et des intestins montrant une prédominance des cellules dendritiques conventionnelle de type 2 (cDC2) au sein des organes lymphoïdes drainant les poumons (Granot *et al.*, 2017).

Bien que les DC murines soient différentes de leur homologues humaines, leur étude a permis d'identifier certaines populations et de comprendre l'origine des DC humaines représentée dans la **Figure 13**. Toutes les DC sont issues d'un précurseur commun, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) CD34⁺ qui vont se différencier en précurseurs myéloïdes (MP) ou en précurseurs lymphoïdes (LP) dans la moelle osseuse (Patente *et al.*, 2018). Les précurseurs myéloïdes vont être à l'origine des cellules précurseurs des monocytes, des macrophages et des DC (MDP) qui donneront les précurseurs des monocytes ainsi que les précurseurs communs aux DC (CDC). Ces CDC vont ensuite se différencier dans la moelle osseuse en des DC plasmacytoïdes (pDC) et en pré-DC conventionnelles (pré-cDC) qui migreront dans le sang et dans les tissus périphériques pour se différencier davantage. Les précurseurs des monocytes se différencieront en monocytes ainsi qu'en macrophages ou DC dérivés de monocytes (Guilliams *et al.*, 2014). Les pré-cDC sont les progéniteurs directs des deux types de cDC les cDC1 et cDC2 (Geissmann *et al.*, 2010). Dans le sang les DC peuvent être divisés en deux sous-populations : les pDC (CD123⁺CD11c⁻) et les cDC ou DC myéloïdes (CD123⁻CD11c⁺) (Boltjes and van Wijk, 2014; O'Keeffe, Mok and Radford, 2015). Dans cette continuité Dzionek et ses collaborateurs ont identifié plusieurs antigènes des cellules dendritiques du sang (BDCA-1, 2, 3, 4) permettant leur classement (Dzionek *et al.*, 2000). Ainsi les cDC peuvent se diviser en deux sous-groupes : les cDC1 exprimant BDCA-2 (CD141) et Clec9A alors que les cDC2 expriment CD1c (BDCA-1). BDCA-2 et 3 avec CD123 sont eux caractéristiques des pDC.

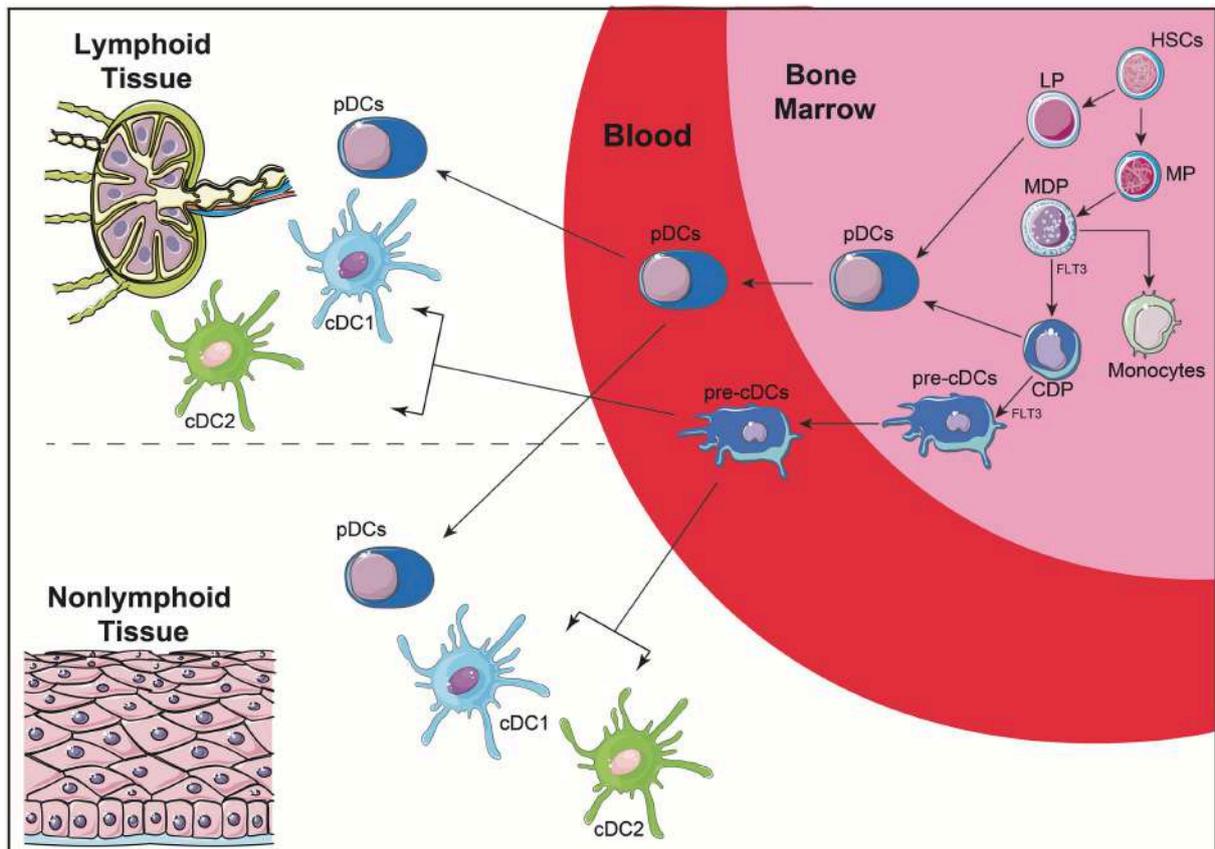


Figure 13: Représentation de l'ontogénie des DC d'après (Patente *et al.*, 2018). Les DC proviennent des HSC dans la moelle osseuse donnant les MP ou LP. Les MP se différencient en MDP pouvant donner à la fois des monocytes et des CDP. Ces CDP dans la moelle osseuse vont donner des pDC ainsi que des pré-DC. Ces pré-DC vont ensuite migrer dans le sang pour donner les deux types de cDC les cDC1 et cDC2. Toutes ces DC (pDC, cDC1 et cDC2) migrent ensuite du sang vers les tissus lymphoïdes ou non lymphoïdes.

ii. Différentes classes de DC

a) Cellules dendritiques conventionnelles (cDC)

Les cDC sont constituées de 2 sous-populations les cDC de type 1 (cDC1) et de type 2 (cDC2). Ces deux types de cDC sont retrouvées dans le sang ainsi que dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (Haniffa *et al.*, 2012; Haniffa, Collin and Ginhoux, 2013). *In vitro*, les cDC1 et les cDC2 peuvent être générées à partir des progéniteurs CD34⁺ après 21 jours de culture avec du Flt3L (fms-like tyrosine kinase 3 ligand) et de la thrombopoïétine (TPO) (Proietto *et al.*, 2012) ou bien avec du Flt3L et des lignées de cellules stromales de moelle osseuse murine (Lee *et al.*, 2015).

Les cDC1 sont caractérisées par l'expression de CD141, du récepteur au chimiokine XCR1, de la lectine de type C CLEC9A et de la molécule d'adhésion cellulaire CADM1 (Haniffa *et al.*, 2012). Ces DC sont particulièrement adaptées pour réaliser la présentation

croisée associée avec l'expression du récepteur aux chimiokines XCR1 (Bachem *et al.*, 2010) et active de façon efficace les LT CD8⁺ jouant ainsi un rôle important dans la réponse immunitaire anti-tumorale et anti-virale. Dans le contexte tumoral et plus précisément dans le mélanome, il a été décrit que les cDC1 à la fois humains et murins sont retrouvées tout le long des marges tumorales favorisant le fonctionnement des CTL et la migration CCR7 dépendant des cDC dans les organes lymphoïdes secondaires pour diriger la présentation des antigènes tumoraux (Roberts *et al.*, 2016).

Les cDC2 sont une population hétérogène se caractérisant par l'expression de diverses molécules communes ou non entre les cellules humaines et murines. L'expression de SIRP α (CD172a) est commune à la fois aux cDC2 humaines et murines, en revanche, le marqueur CD1c est exclusivement présent chez l'homme alors le CD11b sera exprimé chez les cDC2 de souris (O'Keeffe, Mok and Radford, 2015). De plus, il a été décrit l'expression spécifique de molécules membranaires en fonction de la localisation des cDC2. Par exemple, CD1a est exprimé chez les cDC2 dermique et le CD103 est présent dans les cDC2 des intestins (Watchmaker *et al.*, 2014; O'Keeffe, Mok and Radford, 2015). Il a récemment été identifié au sein des cDC2 CD1c⁺ 2 types sous populations les DC2 et DC3 qui sont toutes deux capables d'activer les LT naïfs. Ces deux sous-populations se différencient par l'expression de CD32B et de CD163/CD36 respectivement ainsi que par une production plus importante de la chimiokine CCL19, des cytokines IL-10, IL-12B et IL-18 par les DC2 par rapport au DC3 (Villani *et al.*, 2017). Du fait de leur grande hétérogénéité, ces DC possèdent diverses fonctions. En effet, elles sont capables d'induire la réponse Th1, Th2 et Th17 (Segura *et al.*, 2012; Leal Rojas *et al.*, 2017), mais également d'exercer une réponse régulatrice. Watchmaker *et al.* ont rapporté que ces DC au niveau de l'intestin peuvent induire des Treg (Watchmaker *et al.*, 2014). Bamboat et ses collaborateurs ont observé des effets analogues dans le foie où les cDC2 favorisent le maintien de la tolérance (Sana *et al.*, 2014). Les cDC2 ont d'ailleurs été décrites comme les seules DC capables de produire de l'acide rétinoïque suite à une stimulation avec de la vitamine D3 ce qui a pour conséquence de stimuler les LT CD4⁺ naïfs à exprimer des molécules d'adressage à l'intestin et à produire des cytokines de la voie Th2 (IL-4, IL-15 et IL-13) (Sato *et al.*, 2013).

b) Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Les pDC sont une sous-population de DC qui contrairement au cDC proviennent directement des CDP (common DC precursors) ou des progéniteurs lymphoïdes (Geissmann *et*

al., 2010). Elles se caractérisent par la sécrétion des IFN- α/β suite à une stimulation par les TLR7/9 (Reizis *et al.*, 2011). Cette population des DC est totalement distincte de son homologue chez la souris. En effet, chez la souris les pDC sont caractérisées comme CD11c^{int} CD11b⁻ B220⁺ SiglecH⁺ CD317⁺ alors que chez l'homme elle se caractérisent par l'absence du CD11c et l'expression des molécules CD123, CD303, et CD304 (Merad *et al.*, 2013). Tout comme les autres DC les pDC peuvent être subdivisée en deux sous-groupes en fonction de l'expression du CD2 (Matsui *et al.*, 2009). Ces deux sous-groupes sont capables de sécréter IFN- α/β , mais seule les pDC CD2^{high} produisent la cytokine IL-12p40 et induisent la prolifération des LT CD4⁺ (Matsui *et al.*, 2009). Elles n'ont qu'une faible capacité à présenter les antigènes, mais en revanche grâce à leur forte production d'IFN- α/β , les pDC jouent un rôle important dans la réponse anti-virale (Villadangos and Young, 2008).

c) Cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC)

La grande partie des connaissances acquises au fil des années sur les DC proviennent de l'utilisation *in vitro* de DC dérivant de progéniteurs CD34⁺ stimulés avec du GM-CSF (Granulocyte/macrophage colony stimulating factor) et TNF- α (Caux *et al.*, 1992) ou bien à partir de monocytes traités avec du GM-CSF et de l'IL-4 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). L'étude des moDC est plus aisée, les monocytes représentant entre 15% et 25% des PBMC. De façon identique aux cDC2, les moDC dépendent principalement de l'IRF4 pour se différencier en DC (Lehtonen *et al.*, 2005), mais ne sont pas considérées comme un sous-groupe de cDC étant donné qu'elles sont issues de cellules progénitrices différentes (Geissmann *et al.*, 2010). *In vitro*, les moDC expriment l'intégrine CD11c ainsi que le CMH II et peuvent avoir différentes fonctions à la fois activant ou inhibant la réponse immunitaire en réponse aux différents stimulus auxquelles elles sont soumises. A l'heure actuelle, il est difficile de faire un parallèle entre les moDC *in vitro* et des sous populations de DC classique. Néanmoins, des données récentes suggèrent que les moDC seraient similaires aux DC inflammatoire (Reynolds and Haniffa, 2015) d'autant que les DC inflammatoires font référence à des DC CD11c^{high} CMH II^{high}. D'autres études décrivent les DC inflammatoires comme produisant du TNF- α et iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (Serbina *et al.*, 2003). Segura *et al.* ont décrit la présence de DC inflammatoires dans les fluides inflammatoires comme les ascites de patients atteints de cancer ovariens ou mammaire. Suite à une analyse transcriptomique, ils ont remarqué un phénotype semblable aux moDC générés *in vitro*, capable d'induire la différenciation des T CD4 naïfs en Th17 (Segura *et al.*, 2013).

B. Différents états phénotypiques et fonctionnels des DC

Peu après leur identification, Steinman et ses collaborateurs ont décrit la notion de processus de maturation des DC nécessaire pour leur fonction activatrice des LT (Schuler and Steinman, 1985). Ainsi classiquement les DC sont retrouvées dans des états fonctionnels « immature » et « mature » suite à l'exposition à des stimulus externes. Un troisième état des DC a été décrit étant intermédiaire à ces deux précédents l'état « tolérogène » (Dudek *et al.*, 2013). Ces différents états se distinguent de différentes façons en termes d'expression protéiques et de production de cytokines. Néanmoins, la capacité à activer la réponse T naïve antigène spécifique dans les organes lymphoïdes secondaire est une caractéristique primordiale des DC mature (Worbs, Hammerschmidt and Förster, 2017).

i. Cellules dendritiques immatures (iDC)

Physiologiquement, les iDC sont des cellules résidentes des tissus périphériques agissant comme des sentinelles afin d'initier une réponse contre les signaux de danger du soi et du non soi. Les iDC sont de faibles inductrices de la réponse effectrice lymphocytaire en raison de leur faible expression des molécules de co-stimulation, de CCR7 (récepteurs aux chimiokines CCL19 et CCL21), et de la faible production des cytokines pro-inflammatoires nécessaire à l'activation des LT (Steinman and Swanson, 1995; Trombetta and Mellman, 2005). En revanche, les iDC sont très efficaces dans la capture des antigènes qui est réalisée par phagocytose, micropinocytose ou par le biais de récepteurs à la surface des cellules permettant l'endocytose spécifique. Ceci est permis par l'expression d'un éventail de récepteurs aux pathogènes appelés PRR (Pathogen Recognition Receptors) capables de fixer des ligands regroupés sous le terme de PAMP (Pathogen Associate Molecular Patterns) ou de DAMP (Damage-Associated molecular Patterns) (Hemmi and Akira, 2005; Cerboni, Gentili and Manel, 2013). Ces PRR comprennent différents récepteurs comme les TLR, les récepteurs aux lectines comme DC-SIGN (Geijtenbeek *et al.*, 2000; Muzio *et al.*, 2000; Diebold, 2009), les NLR (NOD-like receptors) et les RLR (RIG-I-like receptors). Pour identifier les pathogènes, les iDCs patrouillent dans les tissus. Pour cela elles expriment à leur surface des récepteurs aux chimiokines de type C (CCR) dont le CCR6 récepteur de la chimiokine CCL20 qui permet d'orienter la localisation des iDC. En effet, la production de CCL20 peut être induite par des cytokines inflammatoires ou des facteurs bactériens afin de recruter les iDC selon l'axe CCR6/CCL20 et initier une réponse spécifique (Cook *et al.*, 2000). Concernant les moDC, les récepteurs CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 interviennent dans la migration des DC sur le site de

l'infection (Sato *et al.*, 1999; Beaulieu *et al.*, 2002; Ataide *et al.*, 2022). Ainsi les iDC ont un rôle à la fois dans l'induction et la maintenance de la tolérance immunitaire (Steinman *et al.*, 2003; Castellano *et al.*, 2004; Deluce-Kakwata-Nkor *et al.*, 2018). En effet, les iDC pourront en fonction du stimulus externe du microenvironnement devenir des DC mature inductrices de la réponse immunitaire ou bien des DC dites tolérogènes qui inversement empêchent l'activation du système immunitaire protégeant des maladies auto-immunes ou favorisant l'échappement immunitaire des pathogènes.

ii. Cellules dendritiques matures (mDC)

La maturation des DC est permise par la détection d'élément perturbant l'homéostasie, par le biais des PRR. Cette maturation provoque des changements dans les cellules au niveau métabolique, cellulaire et transcriptomique permettant aux DC de migrer vers les organes lymphoïdes secondaire pour effectuer la présentation antigénique aux cellules T. Durant le processus de migration/maturation, les DC n'expriment plus le CCR6, mais surexpriment le récepteur CCR7, elles diminuent également l'expression des protéines d'adhésion, réorganisent leur cytosquelette favorisant leur faculté migratoire vers les organes lymphoïdes secondaires (Winzler *et al.*, 1997). De plus, elles perdent leur activité d'endocytose ainsi que l'expression des différents PRR au profit de l'augmentation de l'expression des molécules de présentation antigénique (CMH-I/II) et des molécules de co-stimulation (CD80, CD83, CD83) (Reis e Sousa, 2006) leur permettant d'interagir avec les LT.

L'interaction entre les mDC et les LT dans les organes lymphoïdes secondaires se fait par le biais de la synapse immunologique représentée en **Figure 14** permettant aux DC de présenter et d'activer les LT naïfs. Pour une activation correcte des LT 3 signaux sont nécessaires. Le signal 1 ou signal de stimulation est l'interaction entre le complexe CHM (I/II)-peptide des DC avec le complexe TCR-CD3 des LT. Le deuxième signal (signal de co-stimulation) correspond à l'interaction entre les molécules de co-stimulation (CD80, CD83, CD83 et OX40L) sur les DC avec leur ligand le CD28 présent sur les LT. Parallèlement la glycoprotéine CD40 exprimée sur les DC se lie à son ligand CD40L afin de consolider les interaction DC/LT et l'activation de la réponse T effectrice. Enfin le troisième signal qui se met en place est la production par la DC de diverses cytokines permettant l'activation des LT.

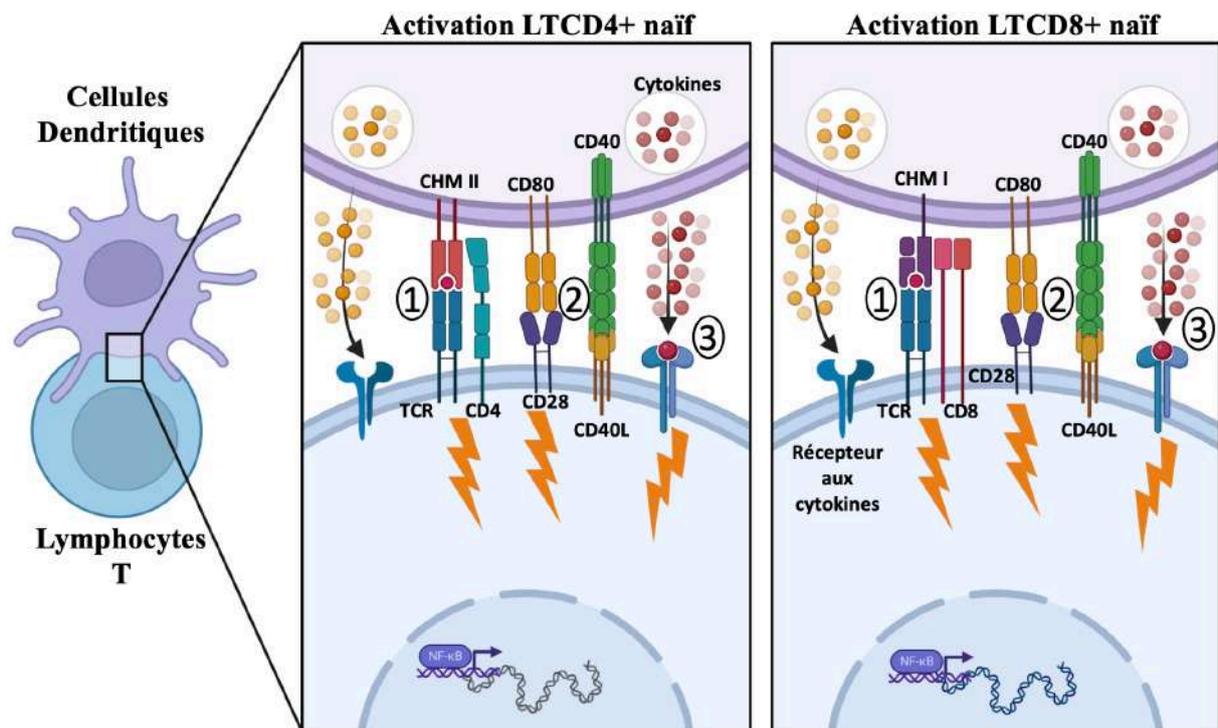


Figure 14: Schéma de la synapse immunologique réalisée par (Anthony LEFEBVRE) sur Biorender (<https://www.biorender.com/>). Suite à la capture de l'antigène pathogène suivi de la migration/maturation dans les organes lymphoïdes secondaires, la DC va présenter le peptide antigénique aux LT naïfs *via* la synapse immunologique. Le signal (1) consiste en la présentation du peptide antigénique par le CHM I ou II respectivement au complexe TCR-CD3 des LT CD8 et LT CD4 naïfs. Ce premier signal dit de stimulation est accompagné d'un signal (2) (co-stimulation) consistant en l'interaction entre les récepteurs de la famille B7 des DC (CD80, CD83 ou CD86) et le ligand CD28 présent sur les LT. Cette interaction est renforcée par la liaison du CD40 sur les DC à son ligand CD40L présent sur les LT. La mise en place des deux premiers signaux permet aux DC de réaliser le signal (3) consistant à la production de cytokines inflammatoires captées par les LT. Ces cytokines déclencheront l'activation de facteurs de transcriptions dans les LT comme la voie NF-κB, aboutissant à l'activation des LT CD4⁺ en LTCD4⁺ Helper et des LTCD8⁺ en LTCD8⁺ cytotoxiques.

Lorsque les DC interagissent avec les LT CD4⁺, elles vont produire des cytokines différentes en fonction du microenvironnement et de la nature de l'antigène pris en charge par le DC. Ainsi elles vont pouvoir induire la différenciation des LTCD4⁺ naïfs (Th0) en différents sous-types de T-helper (Th) comme la voie Th1 (Constant *et al.*, 1995; Kadowaki, 2007), Th2 (Jenkins *et al.*, 2007), Th17 ou bien en Treg (**Figure 18**). Pour l'induction de la différenciation en Th1, les mDC sécrèteront de l'IL-12. Afin d'orienter une différenciation en cellules Th2, les mDC produiront de l'IL-4 et de l'IL-2. La voie TH17 est permise par la production d'IL-6 de TGF-β. Enfin, les DC peuvent également induire la différenciation des LTCD4⁺ naïfs en lymphocytes T régulateurs *via* la production de TGF-β et d'IL-10 (**Figure 15**).

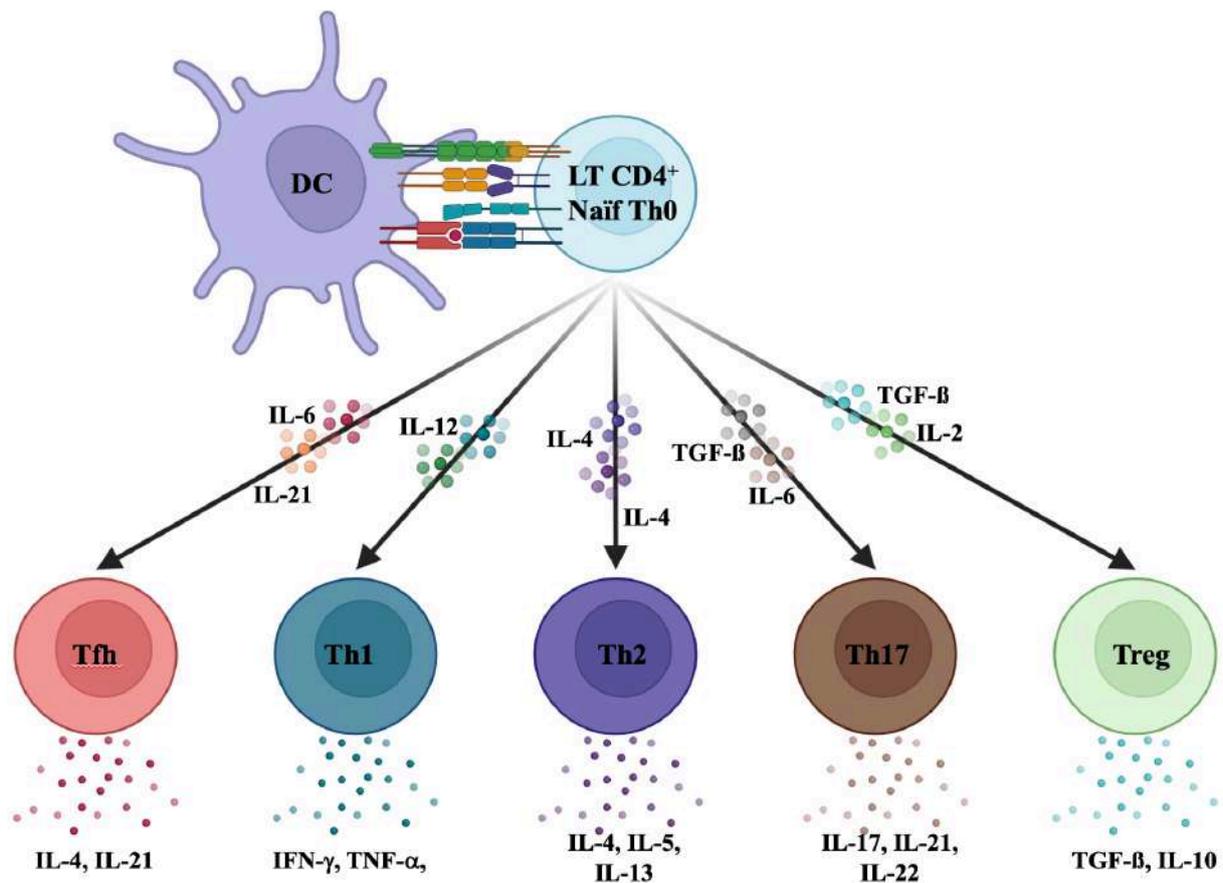


Figure 15: Polarisation des LT CD4⁺ après activation par les DC réalisée par (Anthony LEFEBVRE) sur Biorender (<https://www.biorender.com/>). Après activation par reconnaissance de l'antigène pathogène, la DC va présenter au LT CD4⁺ naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette présentation du peptide antigénique permet l'activation des LT CD4⁺ (Th0) en LT CD4⁺ effecteurs. En fonction de la nature du pathogène reconnue par la DC, celle-ci va sécréter différents profils de cytokines qui orienteront l'activation des LT CD4⁺ Th0 en LT CD4⁺ effecteurs de la voie Tfh, Th1, Th2, Th17 ou Treg.

Les DC ont également comme caractéristiques d'effectuer la présentation croisée (Segura and Amigorena, 2015). Ce phénomène a été décrit par Bevan en 1976 et définit la présentation par le CHM I d'antigène capté dans le milieu extracellulaire ce qui permet au DC de déclencher la réponse contre des antigènes intracellulaires provenant d'autres types de cellules (Bevan, 1976). Ceci est particulièrement utile pour contrer les pathogènes qui échappent à la reconnaissance par les APC (Sánchez-Paulete *et al.*, 2017) ou bien permet d'activer les LT CD8 en absence des LT CD4 Helper (Young and Steinman, 1990). La présentation croisée est également impliquée dans l'induction de la tolérance aux auto-antigènes intracellulaires qui ne sont pas exprimés par les APC et, alors, appelée tolérance croisée (Kurts *et al.*, 1997; Rock and Shen, 2005).

iii. Cellules dendritiques tolérogènes (tDC)

Les cellules dendritiques tolérogènes (tDC) sont définies comme des DC régulatrices favorisant la tolérance immunitaire (Steinman, Hawiger and Nussenzweig, 2003). Contrairement aux mDC, les tDC favorisent la fonction et la production des Treg qui en retour inhibent les lymphocytes T effecteurs. Elles ont pour rôle physiologique de maintenir l'homéostasie immunitaire en protégeant du développement des maladies auto-immunes. En revanche dans certaines conditions et notamment dans le contexte tumoral, cette fonction de frein à la réponse immunitaire permet aux cellules tumorales d'échapper à l'élimination par le système immunitaire et ainsi de se développer.

a) Caractéristiques

Les tDC sont considérées comme des cellules dendritiques dans un état phénotypique intermédiaire entre cellules matures et immatures et sont dénommées DC semi-matures (**Figure 16**). En effet, elles expriment les molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD83 et CD86) de façon intermédiaire entre les iDC et les mDC. Contrairement aux mDC qui induisent l'activation des LT naïfs en LT effecteurs, les tDC favoriseront l'émergence des Treg et induiront l'anergie des LT effecteurs. Pour parvenir à cela, les tDC produisent très peu de cytokines proinflammatoires (IL-12, IL-6, TNF- α) en faveur d'une production importante de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β et expriment de façon importante les molécules inhibitrices comme PD-L1, CTLA-4 et FasL (Steinman, Hawiger and Nussenzweig, 2003). De plus, il a été rapporté que les tDC produisent l'enzyme indoléamine 2, 3-dioxygénase (IDO) molécule de rétrocontrôle du système immunitaire. En effet, IDO est liée à l'inhibition de la prolifération et de la survie des LT (Hwu *et al.*, 2000; Terness *et al.*, 2002). Pour cela IDO métabolise le tryptophane nécessaire à la prolifération des LT effecteurs en kynurénine qui provoque leur anergie et leur mort par apoptose (Frumento *et al.*, 2002). Parallèlement, IDO a été décrite comme favorisant le développement fonctionnel des Treg (Xie *et al.*, 2015) *via* la production de TGF- β . Ainsi par le biais de ces différents changements phénotypiques et fonctionnels les tDC vont pouvoir instaurer une tolérance immunitaire vis-à-vis des pathogènes ou des cellules du soi.

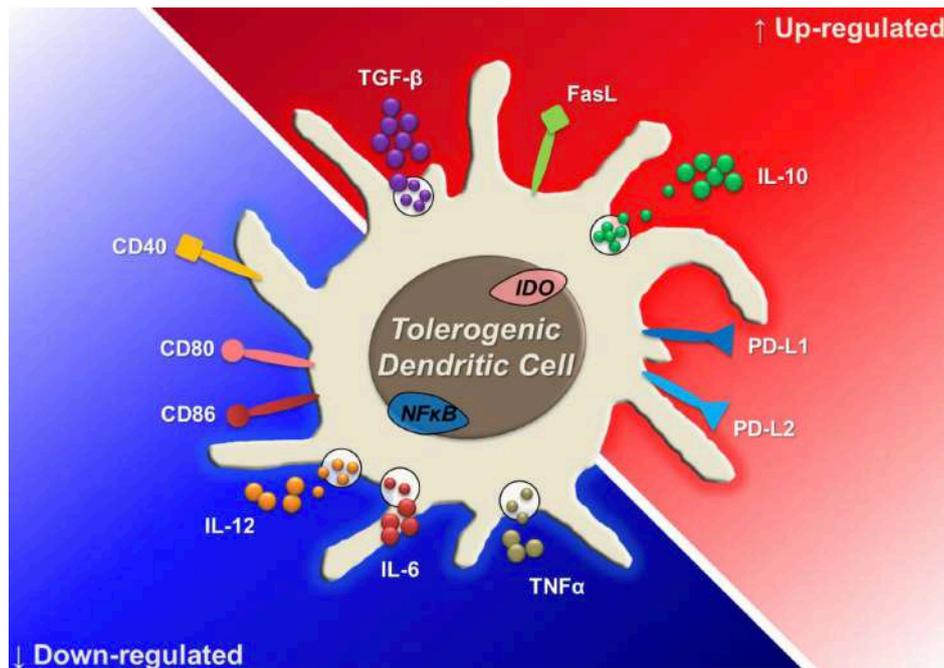


Figure 16: Caractéristiques générales des cellules dendritiques tolérigènes (Yoo and Ha, 2016). Parmi ces caractéristiques nous retrouvons la diminution d'expression des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD83, CD86) qui sont nécessaires pour la synapse immunologique et l'activation des LT. Les cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-6 et TNF- α sont moins produites et le facteur de transcription NF- κ B est également dérégulé dans les tDC. Parallèlement nous observons une augmentation des protéines de rétrocontrôle immunitaire PD-L1, PD-L2, CTLA-4 et FasL ainsi qu'une augmentation de production de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β .

b) Génération des tDC *in vitro*

L'étude des tDC *in vitro* a mené au développement de différents protocoles permettant leur génération à partir de cytokines, de molécules organiques ou chimiques ou bien lors de système de co-culture. L'utilisation de cytokines a été décrite dans plusieurs modèles. Par exemple le traitement de moDC avec de grande quantité d'IFN- γ induit des moDC qui ne sont pas capables de présenter efficacement aux LT et qui induisent une expression importante de FoxP3 dans les LT CD4⁺ déclenchant la fonction des Treg (Eljaafari, Li and Miossec, 2009). L'utilisation d'IL-10 et de TGF- β a également montré une capacité à induire des tDC à partir de DC dérivées de moelle-osseuse de souris (BMDC) (Haase, Jørgensen and Michelsen, 2002; Thomas *et al.*, 2013). En outre le traitement avec des cytokines, certains composés chimiques permettent l'obtention de tDC. L'utilisation de la dexaméthasone (Dx) un stéroïde de synthèse et agent tolérigène est utilisé classiquement *in vitro* et permet de générer des tDC produisant beaucoup d'IL-10 (Bosma *et al.*, 2008). De même la vitamine D3 un autre agent tolérigène et notamment la forme active 1,25(OH)₂D₃ dans le traitement des DC abouti à l'obtention de tDC

(Matsuzaki *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2011). Dans les deux cas, les tDC obtenues expriment moins les différentes protéines de présentation antigénique et de co-stimulation et n'activent pas correctement les LT. La combinaison de ces 2 agents permet de très bons résultats avec l'obtention de tDC semi-mature, produisant peu ou pas d'IL-12 et sécrétant de forte quantité d'IL-10 (Nikolic and Roep, 2013; Volchenkov *et al.*, 2013) et sont également utilisés afin de générer des tDC *in vivo* (Farias *et al.*, 2013). La génération des tDC est une chose complexe, en fonction des protocoles utilisés des variations phénotypiques sont observables. Toutes les méthodes de générations ne permettent pas de moduler de façon identique l'expression des molécules de co-stimulation ou des récepteurs aux chimiokines comme le CCR7 qui est exprimé par les tDC générées en présence de TGF- β , mais absente dans celles en présence d'IL-10 ou bien de DX et de vitamine D3 (Adnan *et al.*, 2016). Néanmoins, la suppression de la réponse des LT effecteurs et la génération de Treg est une caractéristique commune à toutes ces méthodes. Ainsi le phénotype des tDC dépend de l'origine et des conditions de générations de ces cellules (Navarro-Barriuso *et al.*, 2018).

c) Propriétés régulatrices des tDC

Les tDC sont des cellules qui sont bloquées dans leur maturation. Ceci a pour conséquence qu'elles ne peuvent pas activer la réponse T effectrice. Les tDC naturelles mais également celle induites ont des propriétés immunosuppressives qui leur permettent non seulement d'inhiber l'activation de la réponse effectrice mais également d'induire la différenciation des LT CD4⁺ en Treg (Ness, Lin and Gordon, 2021).

1. Suppression de la réponse T effectrice par les tDC

Les interaction tDC-LT à travers les différentes protéines membranaires mais également *via* la sécrétion de cytokines permet aux tDC d'inhiber la réponse T effectrice. Gordon et ses collaborateurs ont démontré que les DC CD8 α ⁺ de rate de souris suppriment la réponse T effectrice Th2 par l'expression d'IDO, mais également par la production d'IL-10 et du TGF- β (Gordon *et al.*, 2005). IDO catabolise le tryptophane en le dégradant, ce qui mène à l'activation de la kinase GCN2 (Generalized Controller Non-derepressible-2) (Liang *et al.*, 2008) aboutissant à l'apoptose des LT (Y.-S. Huang *et al.*, 2020). Les produits de la déplétion du tryptophane en kynurénine comme l'acide 3-hydroxyanthranilique et l'acide quinolinique peuvent également induire l'apoptose des LT dépendant du clivage de la caspase 8 (Fallarino *et al.*, 2002). De plus, il a été décrit que la signalisation FAS/FASL permet au tDC de supprimer

l'activation des LT. En effet, dans les tDC CD8⁺ de rate et les tDC éduquées avec le stroma de la rate, la signalisation de FasL active les caspases 3 et 8 induisant l'apoptose des LT (Süss and Shortman, 1996; Xu *et al.*, 2012).

Les tDC possèdent également à leur surface les molécules de rétrocontrôle immunitaire comme PD-L1, PD-L2 qui se lient à PD-1 sur les LT provoquant leur anergie (Song *et al.*, 2014). De plus le profil cytokinique des tDC est propice à l'inhibition des T effecteurs. La diminution de sécrétion de cytokines proinflammatoire comme l'IL-12 perturbe la fonction des cellules T (Moretto, Lawlor and Khan, 2010). Parallèlement, l'augmentation de production des cytokines immunosuppressives l'IL-10 et le TGF- β participent à la fonction tolérogène des tDC. Par exemple l'IL-10 est connue pour favoriser l'inhibition de la présentation antigénique des DC et par la même occasion permettre sa production par ces DC (Ouyang and O'Garra, 2019). Les DC induites par l'IL-10 (DC10) produisent de l'IL-10 inhibant la voie Th2 à la fois *in vitro* et *in vivo* (Li *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011; Nayyar *et al.*, 2012) probablement par l'induction de l'expression des granzymes B menant à l'apoptose (Coomes *et al.*, 2017). Concernant le TGF- β , il a été montré qu'il participait à la production d'IDO et des mécanismes de suppression sous-jacent (Gordon *et al.*, 2014). De plus, le TGF- β produit par les DC supprime la production d'IFN- γ et la prolifération des LT CD4⁺ chez les patients atteints d'arthrose rhumatoïde (Anderson *et al.*, 2017) et contribue à la suppression des cellules T effectrices de donneurs allergique dans des modèle murins (Gordon *et al.*, 2005). Pour cela la signalisation du TGF- β diminue l'influx de Ca²⁺ induite par le TCR dans les LT empêchant leur activation, mais elle impacte également l'expression des facteurs de transcriptions T-Bet et STAT4 qui sont essentiels pour la différenciation de la voie Th1 (Batlle and Massagué, 2019).

2. Induction de Treg par les tDC

Il existe plusieurs populations de LT CD4⁺ régulateurs dont les CD25⁺Foxp3⁺ sont les plus communs. Parmi ces populations il a été décrit la présence de Treg naturel (nTreg) provenant du Thymus et des Treg induits (iTreg) en périphérie à partir à la fois des LT CD4⁺ naïfs et effecteurs (Feuerer *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010). Ces iTreg sont en parti induits en périphérie par les tDC grâce à l'expression des protéines de rétrocontrôle immunitaire et des différentes cytokines produites. En ce sens , plusieurs études montrent que les DC10 dérivées de monocytes humains possèdent des fonctions tolérogènes et induisent des Treg (Gregori *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). De même les DC10 dérivées de souris produisent de l'IL-10 induisant la prolifération des cellules Th2 qui se différencient en Treg CD25⁺Foxp3⁺ totalement fonctionnels (Huang *et al.*, 2010). De plus, les tDC sécrètent du TGF- β capable d'induire

l'expression de Foxp3⁺ (Chen *et al.*, 2003) par l'activation des facteurs de transcriptions Foxo3a et Foxo1 (Harada *et al.*, 2010) menant à la différenciation des Treg Foxp3⁺ (Rubtsov and Rudensky, 2007; Chen and Konkel, 2010).

Comme mentionné précédemment, les tDC expriment des molécules de rétrocontrôle immunitaire, PD-L1, PD-L2, CTLA-4 influençant l'activation de la réponse T. Ces molécules interviennent également dans la différenciation des Treg. Par exemple PD-L1 exprimé par les tDC induites sous TGF-β intervient à la fois dans l'anergie des LT effecteurs mais aussi dans leur différenciation en Treg (Song *et al.*, 2014).

Enfin, l'induction d'IDO par les DC joue un rôle supplémentaire dans l'induction de Treg. La kynurénine issue de la déplétion du tryptophane permet d'une part de favoriser la fonction suppressive des Treg (Yan *et al.*, 2010). IDO produit par les DC permet la production de TGF-β induisant la différenciation de LT CD4⁺ naïfs en Treg (Chen, 2011). Il existe un réel dialogue entre les DC et les Treg qui deviennent des tDC au contact des Treg par différents mécanismes comme l'induction d'IDO par CTLA-4 (Zhang *et al.*, 2020), l'activation de LAG3 (Liang *et al.*, 2008) (Lymphocyte Activation Gene 3) ou bien la signalisation induite par la neuropiline-1 (NRP1) (Shevach, 2009).

iv. Cellules dendritiques matures régulatrices (mregDC)

Plus récemment, l'utilisation de nouvelles technologies dont le séquençage des ARN par analyse single-cell a permis d'identifier au sein des différentes lignées de DC LAMP3⁺ intratumorale, un programme commun de DC nommé « DC matures enrichies en molécules immunorégulatrices » ou DC matures régulatrices (mregDC) (Zilionis *et al.*, 2019; Maier *et al.*, 2020; Kvedaraite and Ginhoux, 2022). Ces mregDC sont caractérisées par une signature moléculaire spécifique, des DC matures (CD40, CD83, CD86), de migration (CCR7 et ICAM) ainsi que des molécules caractéristiques de l'immunosuppression (PD-L1, PD-L2 and CD200). (Maier *et al.*, 2020). Ces nouvelles technologies de séquençage haute résolution ont permis de détecter ce programme de DC au sein des DC myéloïdes infiltrant les tumeurs d'HCC (Q. Zhang *et al.*, 2019) ou de cancer pulmonaire (Lavin *et al.*, 2017; Zilionis *et al.*, 2019; Maier *et al.*, 2020). D'autres études ont constaté la présence de ces mregDC dans différents modèles tumoraux (Gerhard *et al.*, 2021; S. Cheng *et al.*, 2021). De plus, dans un modèle expérimental à la fois les cDC1 et les cDC2 expriment les protéines associées au mregDC (PD-L1, CD40 et IL-12) lors de la rencontre avec la tumeur (Maier *et al.*, 2020). Maier *et al.* ont par ailleurs montré que chez les souris les cDC1 et cDC2 contribuaient à la population de mregDC. De façon identique les mregDC dans les tumeurs humaines incluent des DC avec des marqueurs

transcriptionnels ressemblant aux cDC1 et cDC2 (Zilionis et al., 2019; Maier et al., 2020). De façon intéressante, dans le contexte tumoral, les mregDC ont une fonction pro-tumorale et peuvent présenter un défaut d'expression et de production de l'IL-12 dépendant du microenvironnement tumoral (Maier et al., 2020). En plus de la description transcriptionnelle de ces DC, les auteurs rapportent un rôle négatif de l'IL-4 produite par les mregDC. En effet, l'IL-4 joue un rôle central au détriment de la fonction effectrice des mregDC notamment via le blocage de la sécrétion de l'IFN- γ , nécessaire à la production de l'IL-12 (Maier et al., 2020). Une étude récente a d'ailleurs montré dans un modèle murin que la délétion de TIM-3 dans les DC favorisait la réponse anti-tumorale (Dixon et al., 2021). En ce sens Maier *et al* soulignent que les DC avec une absence de TIM-3 ont une plus faible signature mregDC induite par l'IL-4 et expriment moins le récepteur à l'IL-4 confortant le possible rôle de TIM-3 dans l'acquisition du programme mregDC. Plus d'études sont nécessaires afin de mieux cerner les fonctions de ces mregDC dans les cancers, de mieux comprendre le potentiel à la fois pro et anti-tumorale qui semble être directement impacté par le microenvironnement dans lequel elles progressent.

C. Métabolisme des Cellules Dendritiques

i. Les grandes voies métaboliques

Dans toutes les cellules vivantes, le métabolisme est un mécanisme nécessaire permettant la production d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Triphosphate), la survie et la prolifération cellulaire (Kareva and Hahnfeldt, 2013). Les différentes voies métaboliques intervenant dans le fonctionnement des cellules immunitaires sont résumées dans la **Figure 17**. La glycolyse est une des voies métaboliques qui dégrade le glucose pour produire rapidement de l'ATP. Lors de la dégradation du glucose, les produits de dégradations peuvent entrer dans la voie des pentoses phosphates (PPP) qui génère du citrate et participe à la synthèse d'acide gras pouvant servir aux autres voies métaboliques notamment la phosphorylation oxydative (OXPHOS). L'OXPHOS est utilisée par la majorité des cellules et permet la production en grande quantité d'ATP en présence d'oxygène (Everts and Pearce, 2014). L'OXPHOS permet la formation d'ATP *via* la chaîne de transport aux électrons suite à la production d'NADPH par le cycle de Krebs ou cycle TCA (Tricarboxylic Acid cycle) (**Figure 20**). Néanmoins dans certains contextes et notamment dans le contexte tumoral il a été décrit l'utilisation de la glycolyse aérobie à la place de l'OXPHOS, ce qui est appelé effet Warburg (Kelly and O'Neill, 2015). Enfin, l'oxydation des acides gras (FAO) représente la troisième voie métabolique

majeure. Celle-ci permet à partir de la dégradation des acides gras de fournir les précurseurs au fonctionnement du cycle TCA et ainsi la formation d'ATP à travers la chaîne de transport aux électrons.

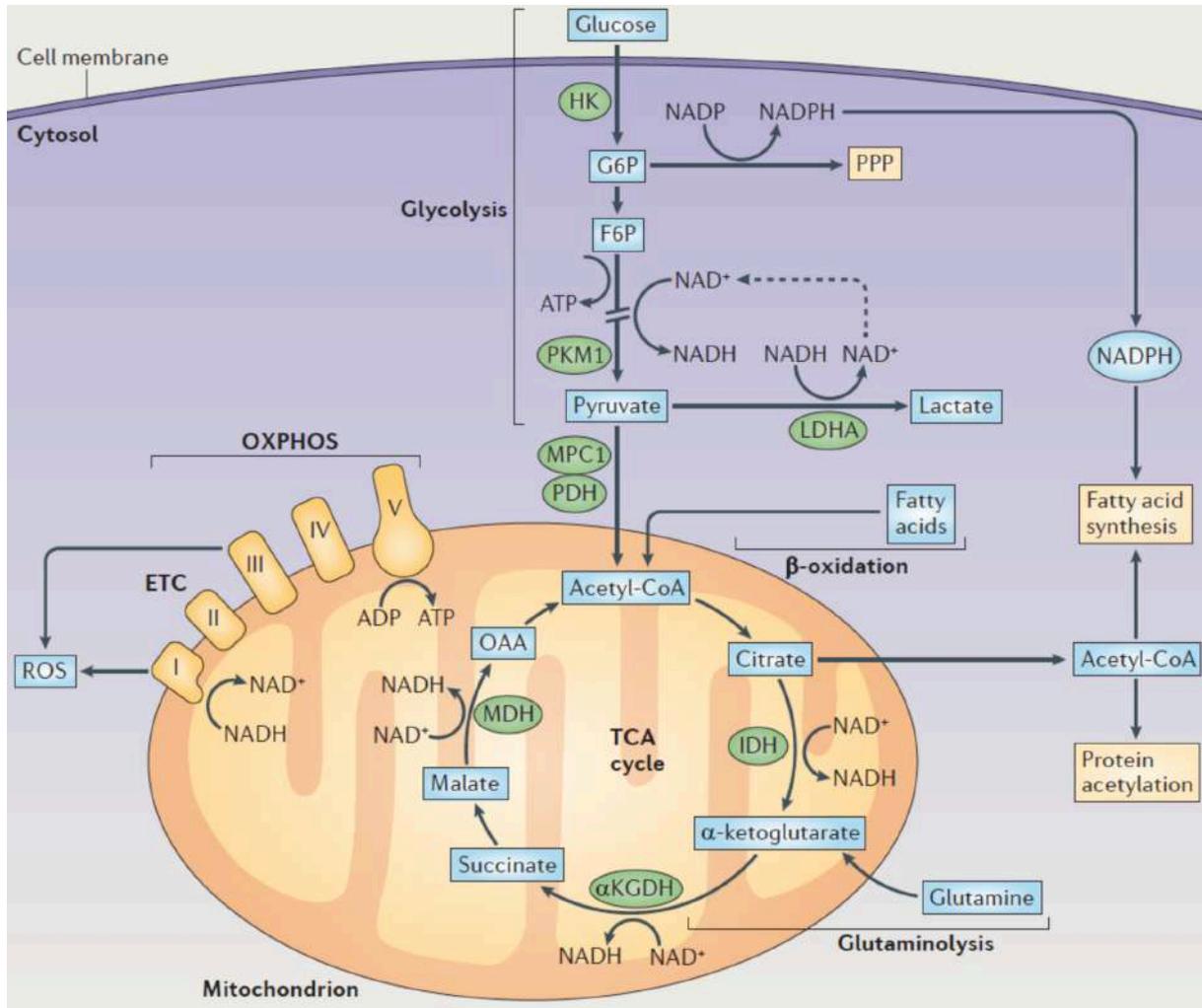


Figure 17: Représentation des grandes voies métaboliques (Pearce and Everts, 2015). La glycolyse permet l'import de glucose et sa conversion en pyruvate dans le cytoplasme des cellules. La glycolyse est en partie reliée à la voie PPP qui produit du NADPH, un cofacteur intervenant dans la synthèse de nucléotides et des acides gras. Le pyruvate à deux devenir potentiel. Il peut se convertir en acide lactique puis en lactate produisant du NAD⁺ servant à la production d'ATP dans la glycolyse. S'il ne sert pas pour la voie des PPP, le pyruvate entre dans la mitochondrie est converti en acétyl-CoA permettant le fonctionnement du cycle de Krebs (cycle TCA). Dans la mitochondrie, le cycle TCA mène à la production de NADH et de FADH₂, qui servent de substrat pour la chaîne de transport aux électrons et favorise l'OXPHOS et la production d'ATP. Les acides gras et la glutamine fournissent également des substrats pour le cycle TCA comme indiqué que le schéma.

ii. Métabolisme des cellules dendritiques en fonction de leur activation

Actuellement il est devenu évident que les différents stades de développement et d'activation des cellules immunitaires sont corrélés avec des variations du métabolisme cellulaire qui sont adaptés au besoin énergétique et synthétiques des cellules. Ces variations ont d'abord été observées chez les populations lymphocytaires T dans lesquelles il a été corrélé les changements métaboliques en fonction de l'état d'activation des cellules (Pearce *et al.*, 2013; Pollizzi and Powell, 2014). En effet, les LT naïfs sont métaboliquement quiescents, ils n'ont besoin que de très peu de nutriments et utilisent principalement l'OXPPOS comme voie de production d'ATP. Ensuite pendant l'activation en T effecteur, les cellules changent et passent à un état métabolique actif caractérisé par l'augmentation du métabolisme glycolytique et glutaminolytique et une diminution du fonctionnement de l'OXPPOS visible par une réduction de la capacité de réserve mitochondriale (SRC) (Pearce *et al.*, 2013). Ainsi lors de l'activation les LT effecteurs utilisent préférentiellement la glycolyse comme source de production d'ATP. Enfin, la transition à un état de LT mémoire se caractérise par un retour à un métabolisme quiescent avec l'utilisation de l'oxydation des acide gras (FAO) pour alimenter l'OXPPOS. Des observations similaires ont été faite concernant le développement et l'activation des DC (Figure 18).

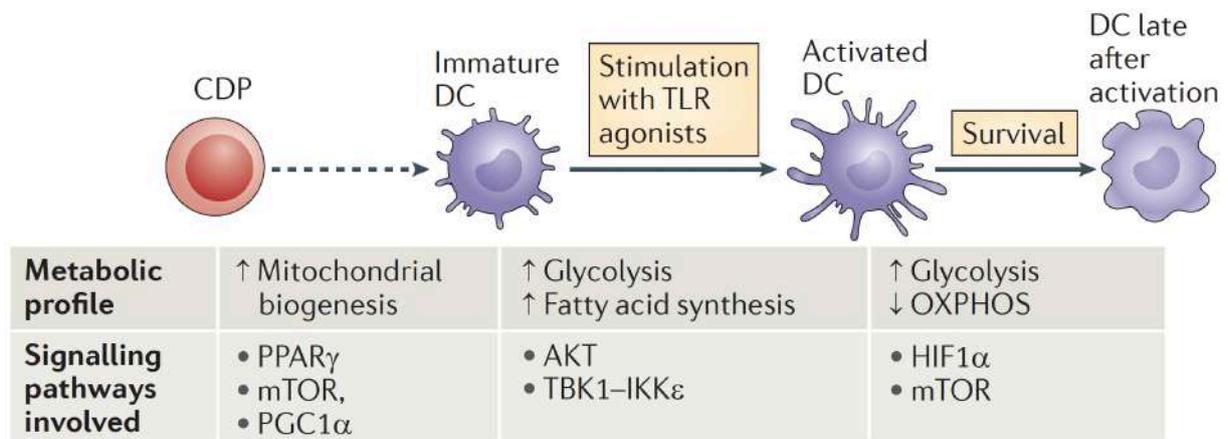


Figure 18: Variation du métabolisme des cellules dendritiques au cours de leur développement et activation (Pearce and Everts, 2015). Le développement des DC à partir des CDP est associé à une biogenèse mitochondriale conduite par PGC1 α et promue par PPAR γ , mTOR et MYC. Les CDP se différencient en DC immature qui utilisent l'oxydation des acides gras comme voie métabolique principale. Ensuite l'activation des DC par des agonistes des TLR mène à un changement métabolique se traduisant par une augmentation rapide de la glycolyse et la voie des pentose phosphate associée à une augmentation simultanée de la capacité respiratoire de réserve et de la synthèse des acides gras ; Ces changements sont permis par l'activation de voie en aval des TLR faisant intervenir AKT, TBK1 (TANK binding kinase 1), IKK ϵ (IkB kinase ϵ) et HK2. Enfin, après activation, les DC restent principalement glycolytiques via l'activation de mTOR et de d'HIF-1 α .

Comme expliqué précédemment, les DC sont issues des CDP ou de monocytes. Peu de choses sont connues sur le métabolisme des CDP en revanche la différenciation des monocytes en DC d'un point de vue métabolique est plus renseignée. La différenciation des monocytes par l'ajout de GM-CSF et d'IL-4 s'accompagne par une augmentation de l'expression de PPAR γ (peroxisome proliferator-activats receptor- γ) (Le Naour *et al.*, 2001; Ishikawa *et al.*, 2007), qui est le facteur de transcription contrôlant le métabolisme lipidique et PGC1 α (PPAR γ co-activator 1 α). L'augmentation d'expression de PPAR γ et PGC1 α précède une hausse de la biogenèse mitochondriale indispensable à la bonne différenciation des monocytes puisque son inhibition bloque la différenciation en DC (Del Prete *et al.*, 2008; Zaccagnino *et al.*, 2012). De plus, la différenciation des monocytes en DC *in vitro* et le développement des DC dans les organes lymphoïdes et les tissus périphériques *in vivo* dépendent de l'oxydation des acides gras (Rehman *et al.*, 2013). La kinase mTOR (serine/threonine kinase mammalian target of rapamycine) constituée de deux complexes mTORC1 et mTORC2 joue un rôle dans la régulation du métabolisme cellulaire (Laplante and Sabatini, 2012). mTOR en parallèle de la synthèse des acides gras occupent une place importante dans la différenciation des DC. En effet une inhibition de mTOR avec de la rapamycine perturbe la différenciation des pDC et cDC aussi bien que celle des moDC (Hackstein *et al.*, 2003; Sathaliyawala *et al.*, 2010). Au sein des deux complexes de mTOR, mTORC1 occupe une place importante dans la différenciation des DC. En effet, mTORC1 induit l'expression de MYC qui agit comme un facteur de transcription favorisant l'expression de gènes codant des protéines du métabolisme et intervient dans la biogenèse mitochondriale en influençant l'expression de gènes comme la NADH oxydase du complexe 1 de la chaîne de transport aux électrons (Li *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011). Ainsi la mise en place de ces voies de signalisation permet la différenciation des DC. Une fois différenciées les DC sont dans un état immature qui ne demande que très peu d'énergie. Ainsi la dégradation des protéines et des triacylglycérols fournit les acides aminés et les acides gras pour la production d'ATP par la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (Pearce and Everts, 2015). En ce sens, il a été montré que les BMDC utilisent l'oxydation des acides gras comme source d'énergie pour l'OXPHOS (Krawczyk *et al.*, 2010). Les BMDC consomment également du glucose qui pourrait servir de source de carbone supplémentaire afin d'alimenter l'OXPHOS (Krawczyk *et al.*, 2010).

Lors de l'activation des DC par les TLR, il est observé un changement très rapide dans le métabolisme avec une augmentation de la consommation de glucose et de production de lactate témoignant d'une augmentation de la glycolyse (O'Neill and Pearce, 2016). Cette

augmentation a été également observée dans d'autres populations de DC comme cDC CD8 α ⁺CD11b⁺ et chez les BMDC (Jantsch *et al.*, 2008; Krawczyk *et al.*, 2010). De plus, l'inhibition de la glycolyse avec l'utilisation du 2-déoxyglucose (2-DG) empêche l'activation des DC (Everts *et al.*, 2014) démontrant l'importance de ce changement métabolique dans l'activation avec les agonistes des TLR. La voie AKT active l'enzyme Héxokinase 2 pour augmenter la glycolyse et le cycle TCA résultant à l'augmentation de la voie PPP et à la formation de citrate et la synthèse d'acide gras. La voie NF- κ B est également déclenchée et peut provoquer un stress dans le réticulum endoplasmique stimulant la réponse aux protéines non replié (UPR, unfolded protein response) favorisant la synthèse d'acide gras (Pearce and Everts, 2015). Durant la glycolyse, le glucose se décompose et entre dans la voie PPP pour produire du lactate qui permettra la fabrication d'ATP. Parallèlement, le pyruvate issu de la dégradation du glucose rentre dans le cycle TCA et soutien la production de membranes lipidiques et la biosynthèse des macromolécules (MacIver, Michalek and Rathmell, 2013). Néanmoins, suite à une forte l'activation des TLR, l'OXPPOS et la FAO sont réduites en raison de l'expression d'iNOS (inducible nitric oxide synthase) et de l'inhibition de l'APMK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase). Suite à l'activation par les TLR, les DC produisent de l'oxyde nitrique (NO) qui permet de conserver cette glycolyse à long terme. Certaines DC expriment NOS2 (l'oxyde nitrique synthase 2) ce qui favorise chez elles la glycolyse aérobie en altérant le fonctionnement de la chaîne de transport aux électrons par le biais de NOS2. En revanche, la plupart des DC sont dépourvues de NOS2 et mettent en place des mécanismes dépendant de l'IFN de type I, d'HIF- α , de TBK1 et IKK ϵ pour maintenir une glycolyse constante à long terme (Peng *et al.*, 2021). De plus, *in vitro* il a été montré un rôle du glucose dans les fonctions de migration des DC. Le blocage de la glycolyse empêche l'oligomérisation du CCR7 le récepteur à la chimiokine CCL21 et CCL19 et réduit les capacités de déplacement des DC. Par ailleurs elles ne possèdent plus leur aspect allongé avec des dendrites mais reste circulaire suggérant que le glucose aurait également un rôle dans le remodelage du cytosquelette (Guak *et al.*, 2018).

Contrairement aux mDC, les tDC sont plus enclins à utiliser l'OXPPOS et la FAO. Ce changement métabolique entraîne un changement de fonction. Cette modification permet l'obtention d'une grande quantité d'énergie nécessaire aux fonction inhibitrices (Sim, Ahl and Connolly, 2016). Dans une étude récente, Malinarich *et al.* montrent au sein des tDC une expression plus importante de gènes liés à l'OXPPOS notamment des complexes II et IV de la chaîne de transport aux électrons (Malinarich *et al.*, 2015). De plus il a été montré que l'IL-10 produite par les tDC bloque le changement métabolique suite à une stimulation par les TLR et

favorise l'OXPPOS (Nikolic and Roep, 2013). En outre il est observé une activité mitochondriale importante ainsi que la production de ROS par les tDC en association avec la FAO et l'utilisation des triglycérides comme sources de carbone. En lien avec ces observations, une inhibition de la FAO avec l'étomoxir augmente l'activation des LT et diminue l'OCR des tDC (Malinarich *et al.*, 2015).

Ainsi le métabolisme des DC occupe une place centrale dans la mise en place de leur fonction effectrice ou tolérogène et une bonne compréhension de ces changements métaboliques pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques dans le but de rétablir une activation par les DC ou d'inhiber l'activation pour réduire une réponse immunitaire trop importante.

IV- Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le CNP est une tumeur des voies aérodigestives supérieures associée dans près de 100% des cas à une infection par EBV. Le CNP est caractérisé par un infiltrat immunitaire immunosuppresseur extrêmement développé qui favorise l'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire et participe au développement et à la progression du CNP. Deux acteurs majeurs ont été décrits dans ce microenvironnement immunosuppresseur, à savoir les Treg et les exosomes tumoraux de CNP. En effet, ces deux acteurs possèdent des propriétés immunosuppressives participant activement au développement du CNP, lui permettant ainsi d'échapper à la réponse immunitaire anti-tumorale. Des travaux récents de notre équipe ont montré que les ExoCNP favorisent la prolifération, la fonction suppressive des Treg et la conversion des LT conventionnels en LT régulateurs. De plus, comme abordé dans l'introduction sur les tDC, l'un des mécanismes les plus connus dans l'induction des Treg fait intervenir les tDC, qui en contribuant à l'évasion immunitaire, altèrent la réponse immunitaire.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été dans un premier temps de déterminer si les exosomes tumoraux de CNP étaient capables de modifier le phénotype et/ou la fonction des DC afin de générer des tDC. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la capacité potentielle des exosomes de CNP à attirer les tDC, comme il a été observé pour l'attraction des Treg au site tumoral par les exosomes dérivés de CNP. Ensuite, les résultats obtenus ont été comparés et corrélés à des expériences réalisées avec des exosomes de patients atteints de CNP. Enfin, dans le but de comprendre plus finement les mécanismes d'actions des exosomes, responsables de l'effet sur les DC, nous avons choisi d'étudier l'impact de la galectine-9 et de son blocage sur le développement des DC.

Matériels
Et
Méthodes

MATERIELS ET METHODES

A. Production et caractérisation des exosomes de CNP

i. Lignée cellulaire de CNP

Les tumeurs (C15) dérivées d'une patiente Algérienne EBV positif ont été xéno greffées et propagées en sous cutanée dans des souris SCID comme décrit précédemment (Klibi *et al.*, 2009). En accord avec les directives institutionnelles, des souris homozygotes CB-17 scid/scid (SCID) ont été hébergées dans des conditions spécifiques exemptes d'agents pathogènes à l'animalerie de l'Institut de Biologie de Lille (IBL, Lille France). Le poids de chacune des souris a été suivi ainsi que le volume tumoral mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. La masse tumorale a été mesurée suite à la récupération des tumeurs.

ii. Production des exosomes tumoraux de CNP

Les exosomes dérivés de tumeur C15 (ExoC15) ont été isolés *in vitro* à partir des surnageants de culture. Brièvement, après exérèse des tumeurs, ces dernières ont subi une digestion enzymatique pendant 3h à 37°C dans de la collagénase II (2mg/mL) (Serlabo, Entraigues-sur-la-Sorgue, France) et de la DNase I (5µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis). Ensuite les cellules ont été individualisées et mise en culture pendant 48h en présence d'une faible concentration de sérum de vœux fœtal (SVF, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) clarifié (1,5%). A l'issue des 48h de culture, les surnageants de culture ont été récupérés puis stockés à -80°C pour les futurs isolements d'exosomes.

iii. Isolement des exosomes

L'isolement des exosomes à partir des surnageants de culture des xéno greffes C15 a été effectué par ultracentrifugation différentielle suivi d'une étape de purification sur coussin de D20/sucrose (D2O, Sigma-Aldrich Chine, Lyon, France) comme décrit précédemment (Mrizak *et al.*, 2015). Brièvement, les surnageants de culture de cellules tumorales ont été centrifugés à 300g (10 min), 1900g (15 min) et 12000g (35 min) afin de séparer des surnageants les cellules mortes, les débris cellulaires ainsi que les ADN à haut poids moléculaire. Parallèlement pour obtenir les exosomes de donneurs sains (ExoDS) ou de patients CNP (SEVPatient), les plasmas ont été centrifugés à 2000g (30 min) puis 12000g (35 min). Ensuite, les surnageants et les plasmas ont subi les mêmes cycles d'ultracentrifugation à savoir une ultracentrifugation à 127 811g (48min) en utilisant un rotor TI50.2 (Beckman Coulter, États-Unis). Les microvésicules contenues dans le culot ont été purifiés par flottation sur un coussin de sucrose en solution dans

l'eau lourde (D2O, Sigma-Aldrich Chine, Lyon, États-Unis). Le culot a été remis en suspension dans du PBS^{-/-} chargé au sommet d'une solution de 1mL de sucrose (D2O (Tris 20 mM, saccharose à 30% de D2O, pH 7.4)) dans un tube de polycarbonate (Beckman Coulter, États-Unis). Le coussin de sucrose a été soumis à une ultracentrifugation à 77 175g pendant 75 min sur un rotor SW41Ti (Beckman Coulter, États-Unis). L'anneau contenant les exosomes a ensuite été recueilli, replit dans du PBS et les exosomes ont été sédimentés par une ultracentrifugation à 109 655g (90 min) avec un rotor SW41Ti (Beckman Coulter, France). Enfin, les exosomes ont été lavés par ultracentrifugation à 128 405g (55 min) en utilisant un rotor Beckman TLA100.4 (Beckman Coulter, France). Les exosomes isolés ont été dilués au 1/100 et la concentration en protéine totale a été quantifiée selon les instructions du fabricant (Biorad, Hercules, CA, États-Unis) par un dosage selon la méthode de Bradford et en utilisant le logiciel Ascent™ Software v2.06 (Multiskan RC Thermo LabSystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). Les exosomes ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à leur future utilisation.

iv. Caractérisation des exosomes par Microscopie Électronique

Environ 2µg d'exosomes ont été dilués dans du PBS et placés sur des grilles de cuivre recouvertes de formvar, rincées et contrastées avec 2% d'acide phosphotungstique (PTA). Les grilles ont été rincées une fois avec du PBS, puis fixées avec du glutaraldéhyde et contrastées avec 2% de PTA. Les images ont été obtenues avec un microscope électronique à transmission (MET) Hitachi H7500 équipé d'une caméra numérique grand champ 1024x1024-pixels de AMT Advantage HR (Elexience, France).

v. Caractérisation des exosomes par TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing)

La distribution de taille des exosomes isolés a été déterminée par analyse TRPS en utilisant l'Exoid (Izon Bioscience) et des Nanopores NP100 (Izon Biosciences, France). Brièvement, les Nanopores NP100 sont préparés à l'aide de trois solutions différentes : une solution de wetting, de coating ainsi que l'électrolyte (PBS) provenant du kit de réactifs fourni par Izon Bioscience. Avant chaque analyse, la calibration des NP100 a été réalisée avec des billes de calibration (100 nm de diamètre) fournies dans le kit (CPC100 dilué au 1/1000) et testées sous trois pressions différentes. Les fractions d'exosomes ont été diluées à 1/500 ou 1/1000 dans du PBS, chargées dans le Nanopore et analysées aux trois mêmes pressions que les billes de calibration. Les conditions de mesure de l'échantillon étaient les suivantes : un étirement du Nanopore de 45,6mm, une tension permettant d'obtenir un courant de près de

100nA. 500 particules et trois niveaux de pression ont été utilisés pour l'analyse des billes de calibration et des échantillons. Le logiciel Exoid control suite (version V1.0.0.181) a été utilisé pour l'expérience et le logiciel Izon data suite (version V1.0.2.32) a été utilisé pour l'analyse des résultats et la détermination des intervalles de taille et des concentrations des nanoparticules.

vi. Exosomes dérivés de patients atteints d'un CNP

Les exosomes dérivés de patients CNP ont été collectés à partir du plasma obtenus en collaboration avec le Dr. Rafa à l'hôpital Mustapha-Bacha (Alger, Algérie). Les échantillons de patients ont été prélevés avant ou après traitement. Tous les patients traités ont reçu une chimiothérapie à base de cisplatine. Tous les patients ont donné leur consentement écrit avant la procédure d'échantillonnage, conformément aux dispositions légales (Loi Huriet). Certains échantillons de patients ont été regroupés en fonction des stades de développement des CNP et des traitements afin d'obtenir suffisamment d'échantillons pour l'isolement des exosomes. Les exosomes ont ensuite été isolés et dosés à partir des plasmas selon la méthode décrite précédemment.

B. Analyse protéique par Western Blot

Les échantillons d'exosomes ainsi que les différents types de moDC ont été lysés dans un tampon de lyse RIPA qui est constitué de 20mM Tris-HCM, 50 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,02% azide de sodium complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis). Après une centrifugation (14 000 tr/min, 30 min), les fractions solubles ont été récupérées. Les concentrations en protéine ont été mesurées par un dosage selon la méthode de Bradford (Biorad, Hercules, CA, États-Unis) en utilisant le logiciel Ascent™ Software (v2.06, Multiskan RC Thermo LabSystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). Les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE à l'aide de gels pré-coulés (NuPAGE®NOVEX 4-12% gradient, Bis-Tris, Life technology, Carlsbad, CA, États-Unis) dans des conditions standards, hormis pour la détection du CD63 ou de CD81, qui nécessite des conditions non réductrices. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF (Immobilon-PTM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis). La membrane a été bloquée pendant 2h à température ambiante (RT) dans un tampon de blocage à base de caséine (2g/L), puis incubée toute la nuit à 4°C avec des anticorps primaires dirigés contre l'anticorps anti-humain HLA-Drα mAb (1:200, sc-53499, Santa Cruz Biotechnology INC, Dallas, TX, États-Unis), anticorps primaire CD63 anti-humain de souris

(1:1000, TS63, Invitrogen, Cambridge, UK), anticorps primaire CD81 anti-humain de souris, anticorps primaire TSG-101 anti-humain de souris (1:500, 4A10, ab83 Abcam, Cambridge, UK), anticorps primaire LMP1 anti-humain de souris (1:1000, CS 1-4, ab78113, Abcam, Cambridge, UK), anticorps primaire anti-IDO de lapin (1 : 400, Cell Signaling Technology, États-Unis), mAB anti-cyclophiline B de souris (1:1000, Cell Signaling Technology, États-Unis) ou mAb anti-galectine-9 CT-L1 de lapin (1:400, Galpharma, Kagawa, Japon) (**Tableau 4**). Les membranes ont été lavées avec du PBS-Tween 0,05 %, puis incubées pendant 1 h à RT avec des anticorps secondaires anti-souris ou anti-lapin conjugués à la peroxydase, (1:10 000, GE Healthcare, Wauwatosa, États-Unis). Les signaux protéiques spécifiques ont été visualisés à l'aide du kit Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) et lu par chimioluminescence avec le LAS-300 (Fujifilm Global, États-Unis) en utilisant le logiciel Image Lab.

C. Isolement des PBMCs

Les échantillons de sang humain ont été prélevés sur des donneurs adultes sains avec un consentement éclairé obtenu conformément à l'approbation de l'établissement français du sang (EFS) (DC-2020-3942). Les cellules mononuclées périphérique du sang (PBMCs) ont été isolées à partir de poches de sang par centrifugation en gradient de densité en utilisant un milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio, Les Ulis, France) et des leucosepsTM (Dutcher, Brumath, France) selon les instructions du fabricant.

D. Tests de prolifération des PBMCs

Les propriétés immunosuppressives des exosomes ont été testées par le biais d'un test de prolifération de PBMCs en co-culture avec les exosomes C15 de CNP, de donneurs sains ou de patients CNP. Les PBMCs ont été isolées du sang comme expliqué précédemment. Les PBMCs ont ensuite été cultivées dans du milieu de culture ML10 comprenant du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Gibco, France) complété par du pyruvate de sodium (1 mM), des acides aminés non essentiels MEM 1x, HEPES (25 mM), 2-mercaptoéthanol (50 µM), gentamicine (10 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis), et 10% de sérum humain AB (SAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis). Les PBMCs ont été activées avec un anticorps anti-CD3 (0,5µg/mL) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) ainsi qu'un anti-CD28 (0,5µg/mL) (Clinisciences, Montrouge, France). Les exosomes C15 de donneurs sains ou de patients CNP ont été ajoutés en culture avec les PBMCs

dans une plaque 96 puits à fond rond (Corning Incorporated, NY, États-Unis) à deux concentrations 0.5µg/mL et 5µg/mL pendant 72h. Parallèlement pour étudier les propriétés immunosuppressives de la galectine-9 (Gal-9, GalPharma, Takamatsu, Japon), nous avons ajouté de la Gal-9 (3 µg/mL) ± l'anticorps bloquant 1g3 (3µg/mL, Biotem, Apprieu, France), l'isotype contrôle (3µg/mL, mouse IgGk1 Biolegend, San Diego, CA, USA) ou du lactose (5mM) (Fluka, St. Louis, MO, USA). Enfin pour étudier l'impact de la galectine-9 dans les effets supresseurs des exosomes de CNP, nous avons incubé l'anticorps bloquant 1g3 (3 µg/mL), l'isotype contrôle (3 µg/mL) ou le lactose (5mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pendant 2h avec les exosomes C15 de CNP avant de les mettre en culture avec les PBMCs. La prolifération des PBMCs a été mesurée après incorporation de [méthyl-3H] -thymidine (1µCi/puits) (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) pendant les 18 dernières heures avant la fin de la culture. La radioactivité a été déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation (1450 Trilux, Wallac, Finlande). Chaque test de prolifération a été réalisé en triplicata et exprimé en coup par minute (cpm) à l'aide du logiciel Microbeta, puis normalisé sur la condition contrôle PBMCs activés (PBMCs A).

E. Isolement des cellules immunitaires (monocytes et lymphocytes)

Les monocytes ainsi que les lymphocytes CD3 (LTCD3) totaux ont été isolés à partir des PBMCs en utilisant respectivement un kit d'isolement CD14⁺ et CD3⁺ à sélection magnétique positive (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) en suivant les recommandations du fournisseur avec une pureté moyenne de respectivement de 95% et de 75%.

F. Génération des cellules dendritique dérivées de monocytes (moDC)

Les monocytes (10⁶ cellules/mL) isolés précédemment ont été cultivés dans des plaques 6 puits (Corning Incorporated, NY, États-Unis) dans du milieu complet RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) et 50 µg/mL de gentamicine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). Afin de différencier les monocytes en cellules dendritique immature (iDC) puis d'obtenir nos différents contrôles de DC mature (mDC) et tolérogène (tDC) nous avons traités les monocytes comme expliqué sur la **Figure 25**. Plus en détail, les monocytes ont été traités pendant 5 jours avec du GM-CSF (25 ng/mL) et de l'IL-4 (10 ng/mL) (PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ, États-Unis) pour permettre leur différenciation en iDC. Au jour 4, nous avons ajouté de la dexaméthasone (393 ng/mL) (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis) pour les futures tDC. Au jour 5, les milieux de culture ont été changés en ajoutant de nouvelles cytokines. Pour obtenir les mDC et tDC contrôles, nous avons respectivement ajouté du TNF α (20 ng/mL) et de l'IL1 β (10 ng/mL) (mDC) ainsi que de la dexaméthasone (393 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis) de la vitamine D3 (39 ng/mL) du TNF α (20 ng/mL) et de l'IL1 β (10 ng/mL) (tDC). En parallèle, les monocytes ont été maintenus en culture jusqu'au jour 5 et servent de contrôle de différenciation. Afin d'étudier l'effet des exosomes de CNP sur les cellules dendritiques, les ExoC15, les ExoDS et les SEVPatient ont été ajoutés en culture avec les monocytes à 5 μ g/mL dès le début des cultures, puis après 5 jours du TNF α (20 ng/mL) et de l'IL1 β (10 ng/mL) ont été ajoutés. Dans le but d'étudier l'effet de la galectine-9 dans la maturation des DC, nous avons ajouté de la Gal-9 (3 μ g/mL) \pm l'anticorps bloquant 1g3 (3 μ g/mL, Biotem, Apprieu, France) \pm l'isotype contrôle (3 μ g/mL, mouse IgGk1 Biolegend, San Diego, CA, USA) ou le lactose (5mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (**Tableau 4**) avec les monocytes en culture. De façon identique à précédemment, après 5 jours de culture, les milieux ont été changés et du TNF α (20 ng/mL) et de l'IL1 β (10 ng/mL) ont été ajoutés. Enfin, pour tester l'impact de la galectine-9 présente sur les exosomes dans la maturation des moDC, nous avons incubé l'anticorps bloquant 1g3 (3 μ g/mL) \pm l'isotype contrôle (3 μ g/mL) ou le lactose (5mM) pendant 2h avec les exosomes de CNP. Les exosomes ont été ajoutés en culture avec les monocytes à 5 μ g/mL et les DC ont été générées comme expliqué précédemment. Les moDCs ont ensuite été récupérées pour réaliser toutes les autres expériences (MLR, RT-qPCR, Western Blot), les moDCs ont été évaluées par cytométrie de flux pour les marqueurs de maturation membranaire au jour 5 et 7. Les surnageants ont été récupérés au jour 5 et 7 de la culture et stockés à -80°C jusqu'à utilisation ultérieure.

G. Test MLR (Mixed Leukocytes Reaction) co-culture DC/LTCD3

Les propriétés fonctionnelles des DC ont été mesurées en évaluant leur capacité à activer ou inhiber la prolifération des LT CD3⁺ dans un test MLR (Mixed Leukocytes Reaction) de prolifération en co-culture. Les différentes DC générées précédemment ont été co-cultivées avec les LT CD3⁺ pendant 48, 72 et 96h avec un ratio 1/10 (DC/LT CD3⁺) dans du ML10 complété avec 10% de SAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis) dans des plaques 96 puits à fond rond (Corning Costar). Les DC ont été préalablement irradiées à 50Gy et les LT CD3⁺ ont été activés avec un anticorps anti-CD3 (1 μ g/mL) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) ainsi qu'un anti-CD28 (0,1 μ g/mL) (Clinisciences, Montrouge, France).

La prolifération des LT a été mesurée après incorporation de [méthyl-3H] -thymidine (1µCi/puits) (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) sur les 18 dernières heures de la culture. La radioactivité a été déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation (β-counter, 1450 Trilux, Wallac, Finlande). Chaque test de prolifération a été réalisé en triplicata et exprimé en coup par minute (cpm) à l'aide du logiciel Microbeta, puis normalisé sur la condition contrôle LT CD3⁺ en co-culture avec les mDC.

H. Analyse des MoDCs par cytométrie en flux

La bonne différenciation et maturation des cellule dendritiques a été déterminée par l'analyse de plusieurs protéines membranaires par cytométrie en flux en utilisant l'Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). Après la récupération des cellules, 5.10⁵ cellules ont été reprises dans 100 µL de PBS et les récepteurs aux parties cristallisable des anticorps (FCR) ont été bloqués avec une solution de blocage des FCR (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) pendant 10 min à 4°C. Ensuite les cellules ont été marquées pendant 30 min à 4°C à l'obscurité avec les anticorps conjugués aux fluorochrome suivant : CD14-Pacific Green, CD11c-Pacific Blue, CD40 - PE, CD80- APC, CD83 – PECy7, CD86 – FITC, HLADR - PerCP et DC-SIGN – APC-Cy7 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) (**Tableau 4**). Pour chaque test, un contrôle non marqué ainsi qu'un contrôle isotypique ont été utilisés pour le réglage du signal positif. Enfin, les médianes d'intensité de fluorescence (MFI) ont été analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, États-Unis).

I. Dosage des cytokines par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

La détection des cytokines a été effectuée dans les surnageants des monocytes aux jours 5 et les surnageants des DCs aux jours 5 et 7 de culture. La sécrétion de l'interleukine (IL)-10, du TGF-β, de l'IL-12p70, de l'IL-6 et de l'IL-4 ont été déterminée par ELISA Sandwich (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, États-Unis). Brièvement, les anticorps primaires purifiés (**Tableau 4**) (BD Pharmingen™, San Jose, CA, États-Unis) ont été coatés toute la nuit à 4°C dans des plaques 96 puits (NUNC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). Après des lavages avec du PBS-Tween 0,05% et un blocage des sites non spécifiques avec du PBS-BSA 3% (Albumine de Sérum Bovin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis) pendant 2h à RT, les surnageants de culture ont été incubés dans les plaques toute la nuit à 4°C. Après

des lavages (PBS-Tween 0,05%), les anticorps secondaire de détection anti-cytokine biotinylé (1µg/mL) (BD Pharmingen™, San Jose, CA, États-Unis) (**Tableau 4**), ont été incubés pendant 90 min à RT. L'excédent d'anticorps a été lavé puis la réaction a été amplifiée par l'ajout de streptavidine-peroxydase à 1/10000ème (Interchim, Montluçon, France) pendant 30 min à RT. Les plaques ont été révélées par l'ajout d'une solution d'H₂O₂ (1/1000ème) et de Dihydrochlorure d'Ortho-phénylènediamine (OPD) à 10mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis) dans un tampon de révélation. Cette réaction a été arrêtée par l'ajout de HCl 2N (VWR, États-Unis). Parallèlement nous avons mesuré la production de l'enzyme IL4I1 par les différentes cellules avec le kit Human IL4I1 DuoSet en suivant les recommandations du fournisseur (R&D SYSTEMS). Les plaques ont ensuite été lues à 492nm sur le spectrophotomètre (Multiskan EX, ThermoLabsystems, France) en utilisant le logiciel Ascent™ Software v2.06.

Tableau 4 : Tableau des anticorps utilisés dans les différentes expériences

<u>Anticorps de Western Blot</u>	Anticorps primaire HLA-DR mab	Clone DA6.147, mouse (Santa Cruz Biotechnology)
	Anticorps primaire CD63 (TS63)	Clone UCHT, mouse (Invitrogen)
	Anticorps primaire CD81	Clone 5A6, mouse (Santa Cruz Biotechnology)
	Anticorps primaire TSG-101	4A10, mouse (Abcam)
	Anticorps primaireIDO	D5J4E, mouse (Cell signaling)
	Anticorps primaire Cyclophiline B	D1V5J, mouse (Cell signaling)
	Anticorps primaire Galectine-9	9CT, Rabbit
	Anticorps primaire LMP1	CS 1-4, mouse (Abcam)
	Anticorps secondaire anti-mouse	IgG (H+L) HRP (Sigma)
	Anticorps secondaire anti-rabbit	IgG (H+L) HRP (Sigma)
<u>Anticorps de cytométrie</u>	<u>Protéine cible – fluorochrome - clone</u>	<u>Isotype</u>
	CD11c – VioBlue – MJ4-27G12	Mouse IgG2b
	CD14 – VioGreen – REA599	Anticorps humain recombinant IgG1
	CD40 – PE – HB14	Mouse IgG1k, mouse IgG1
	CD80 – APC – 2D10	Mouse IgG1k
	CD83 – PE-Vio770 – REA714	Anticorps humain recombinant IgG1
	CD86 – FITC – FM95	Mouse IgG1k, mouse IgG1
	HLA-DR – PerCP – AC122	Mouse IgG2ak, mouse IgG2a
	DC-SIGN – APC-Vio770 – DCN47.5	Mouse IgG1k

<u>Anticorps pour ELISA</u>	<u>Anticorps purifiés</u>	<u>Anticorps biotinylés</u>
Anti-IL-10	IgG1 Rat	IgG2a Rat
Anti-TGF β	IgG2a Rat	IgG2a Rat
Anti-IL-4	IgG2a Souris	IgG1 Rat
Anti-IL-6	IgG1 Rat	IgG2a Rat
Anti-IL-12p70	IgG2b rat	IgG1 Souris
Anti-IL4I1	Anti-IL4I1 de souris	Anti-IL4I1 de rat
<u>Anticorps bloquant</u>	Anticorps anti-Galectine-9 (1g3, mouse IgG1, Biotem)	Isotype IgG1k (MOPC-21, Biolegend)

J. Dosage par HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Le substrat et le produit de l'enzyme IDO (Indoléamine 2,3-dioxygénase) c'est-à-dire le L-Tryptophane (Trp) and Kynurénine (Kyn) ont été quantifiés dans les surnageants des monocytes à J5 et des différents moDC après 5 et 7 jours de culture. L'acide kynurénique, l'indole acide lactique et l'indole acide acétique ont été mesuré dans les surnageants de cultures des différentes moDC après 7 jours de culture. Les échantillons ont été testé en collaboration avec le laboratoire de toxicologie à l'hôpital universitaire de Lille, en France. La concentration des différents substrats et produits a été dosée à l'aide d'une procédure analytique basée sur la chromatographie liquide à ionisation par électrospray couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-ESI/MS/MS). Cette procédure a été développée selon des méthodes publiées précédemment, avec de légères modifications (Zhu *et al.*, 2011). 100 μ L de surnageants de culture ont été analysés après l'ajout de 100 μ L d'acétonitrile contenant du tryptophane-D5 à 50 000 nM comme standard interne. Les échantillons ont été mixés et centrifugés, puis 100 μ L d'échantillons ont été ajoutés à 500 μ L d'eau ionisé. 15 μ L de ce mix ont été injectés dans un système UPLC-MS/MS (détecteur Xevo TQ-S, Waters, Milford, États-Unis) équipé d'une colonne Acquity HSS C18 (Waters, Milford, États-Unis). Les ions de chaque composé analysé ont été détectés en mode ion positif en utilisant la surveillance des réactions multiples. Le logiciel MassLinks (Waters) a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. Les résultats ont été exprimés en nM et le rapport Kyn/Trp a été calculé et normalisé par rapport aux conditions de contrôle (iDC pour le jour 5 et mDC pour le jour 7).

K. Mesure du métabolisme par Seahorse

Le taux de consommation d'oxygène mitochondriale (OCR, O₂ mpH/min) ainsi que le taux d'acidification du milieu extracellulaire (ECAR, mpH/min) des moDC ont été analysés avec l'analyseur de flux extracellulaire XFe96 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, États-Unis) avec le logiciel d'analyse Wave (version 2.6.0). Les microplaques pour le Seahorse XFe96 ont été pré-coatées avec de la poly-L-lysine quelques heures avant l'expérience. Pour la mesure de l'OCR, les moDC ont été récupérées, lavées et reprises dans un milieu OXPHOS (DMEM, 25 mM de glucose, 1 mM de pyruvate, 2 mM de L-glutamine [pH 7.35]). Les cellules (60×10^3 /puits) ont été ajoutées dans les plaques contenant la poly-L-lysine et incubées dans un incubateur sans CO₂ pendant 1h à 37°C. Une mesure complète de l'OCR a été réalisée avec les mDC, les tDC et les DCExoC15 simultanément selon quatre étapes consécutives : respiration basale (sans médicament), inhibition du complexe V mitochondrial (2µM oligomycine A), induction de la respiration maximale par ajout en deux fois de FCCP (cyanure de 4-(trifluorométhoxy) phénylhydrazine) à 0,5 µM puis à 0,75 µM et inhibition de la chaîne de transport aux électrons (1 µM de Roténone et d'Antimycine A) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis). Pour l'analyse de l'ECAR, les différentes moDC ont été récupérées, lavées et reprises dans du milieu pour l'ECAR (DMEM sans bicarbonate, 2 mM de L-glutamine, 143 mM NaCl et 0,5% de rouge de phénol [pH 7.35]) et une mesure complète de l'ECAR a été réalisée également en quatre étapes : glycolyse basale (sans médicament), induction de la glycolyse (10 mM glucose), induction de la glycolyse maximale (2 mM oligomycine) et inhibition totale de la glycolyse (100 mM 2-Deoxy-D-glucose).

L. RT-qPCR

i. Extraction d'ARN

Les ARN totaux des cellules (1.10^6 cellules) ont été extraits en utilisant du Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, États-Unis) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 1.10^6 cellules ont été reprises dans 1 mL de Trizol® et stockées au -80°C. Pour l'isolement des ARN, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés dans les échantillons qui ont été centrifugés à 12 000g pendant 15 min à 4°C. La phase transparente contenant les ARN a été récupérée et précipitée par l'ajout de 500 µL d'isopropanol et stockée à -80°C pendant 10 min. Les ARN ont ensuite été centrifugés à 12 000g pendant 15 min à 4°C et les culots d'ARN ont été lavés avec de l'éthanol 75% et centrifugés à 7 500g pendant 15 min à 4°C puis repris dans 30µL d'eau sans RNase et DNase (Life Technologies, Carlsbad, CA, États-Unis). La

concentration et la pureté des ARN ont été mesurées par spectrométrie en utilisant le NanoDrop (Thermo Scientific, États-Unis). Les ARN ont ensuite été stockés au -80°C avant de future utilisation.

ii. Rétro-transcription des ARNm

2µg d'ARN total ont été complétés avec 5µL de master mix : 1µL oligo dT (8nmol) (roche Diagnostic, Meylan, France), 4µL d'eau dans RNase et DNase et 0,1µL de RNAsin (40U/µL, Promega, charbonnières, France). Ensuite les échantillons ont été incubés à 70°C pendant 10 min, suivi de 5 min à température ambiante. Puis, 10 µL du mix des éléments suivants ont été ajoutés 6 µL buffer 5X (Tris_HCL, KCL, MgCL2) (Invitrogen, UK) + 1 µL de DiThioThreitol (DTT, 0.1M) (Invitrogen, UK) + 2 µL de désoxyribose Nucléotide Triphosphates (dNTPs, 10 mM) (Amersham Biosciences, UK) + 0.1 µL de RNAsin (40U/µL, Promega, charbonnières, France) + 1 µL de Transcriptase Reverse Superscript™ (200U/µL, life technologies, Carlsbad, CA, États-Unis). Les échantillons ont d'abord été incubés à 45°C pendant 60 min puis 5 min à 95°C. Enfin, de l'eau ultra pure (GIBCO-Life Technologies) a été ajoutée pour obtenir la concentration finale de 10 ng d'ADN complémentaire (ADNc)/µL puis stockée au -20°C jusqu'à leur utilisation.

iii. PCR en temps réel sur l'appareil Ari Mx

Les transcrits ont été quantifié en utilisant la méthode de PCR semi quantitative en temps réel avec le système Aria Mx (Agilent technologies, France), dans des plaques PCR-96-LP-FLT plates (Corning Axygen®, Mexico). Dans chaque puits, 10 µL d'un couple spécifique de primers (Eurogentec, Seraing, Belgium) et 1 µL d'ADNc (équivalent de 10ng of RNA/µL) ont été ajoutés. Les réactions de PCR ont été réalisées selon les instructions du fournisseur, en utilisant le test 2X MESA GREEN qPCR MasterMix Plus pour test SYBR® (Eurogentec, Seraing, Belgium). Le programme PCR inclus une dénaturation initiale de 5min à 95°C, suivi de 40 cycles d'amplification standard comme suit : 15sec à 95°C (dénaturation) puis 1min à 60°C (hybridation et élongation). Les produits fluorescents ont été détectés à la dernière étape de chaque cycle.

iv. Expression des donnés

Des réactions de PCR quantitative ont été utilisées pour quantifier l'expression génique de l'activité immunosuppressive ou de l'activité activatrice des DC. Les gènes de ménages GAPDH (Glycéraldéhyde-3-Phosphate Dehydrogenase), HPRT (Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transférase) et 18S ont été utilisés comme contrôle. Toutes les amorces ont été conçues pour la PCR en temps réel (**Tableau 5**) et achetées chez (Eurogentec, Seraing,

Belgium) ou (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis). L'analyse quantitative a été réalisée sur la base du seuil de cycle, les résultats ont été exprimés en $2^{-\Delta\Delta CT}$ conduisant à une valeur arbitraire de 1 pour le groupe de référence pour les histogrammes (Livak and Schmittgen, 2001). Les résultats ont été exprimés en $\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$ conduisant à une valeur arbitraire de 0 pour le groupe de référence pour les Heatmaps. La valeur de chaque puits a été calculée à l'aide du logiciel Agilent Aria Mx V.1.71.

Tableau 5 : Gènes et séquences nucléotidiques correspondantes (sens et anti-sens) utilisées pour la RT-qPCR

Gène	Symbole HGNC	Séquence Sens	Séquence Anti-sens
CCR7	CCR7	GAGACAACACCACAGTGGACTA CAC	GTCAACACGACCAGCCCATT
CD36	CD36	TTGGTTTCTGGGTGGCCAATTCA	TGGGATGATGGTGTTCCTCCCG
DC-LAMP	DC-LAMP	CTGGGCGGGCTTTTCGGCTG	TTCTGCAGCGTGCGGCGAAG
FOXO1	FOXO1	CCGACCTCATCACCAAGGC	TTATGACGAATTGAATTCTTCC
GLUT1	GLUT1	CTTCACTGTCGTGTCGCTGT	CCAGGACCCACTTCAAAGAA
STING	STING	ACTGTGGGGTGCCTGATAAC	TGGCAAACAAAGTCTGCAAG
cGAS	cGAS	GCGGTTTTGGAGAAGTTGAA	TGAATTCTGGGGACTTCCAG
GILZ	TSC22D3	CCGAAATGTATCAGACCCCCA	AACGGAACCACATCCCCTC
IDO	IDO	AAGGTGATGCTGGCCTGCGG	TGGCTGCTGGCTTGCAAGGAAT
ILT3	LILRB4	CCCATGGGACATGAGTAGCC	AGCACTTCTCTGCGATGACG
ILT4	LILRB2	GATGCCCCACTCCGTCTAAG	AGTTGAGTGAGCCGTAGCAC
PD-L1	CD274	AGCCTGGAATTGCAGCTTCA	AAGTTGCATTCCAGGGTCACAT
PD-L2	PDCD1L G2	TTTATATTCATGACCTACTGGCA TTTG	AATTGTCATATTGCTACCATACTCT ACCA
TIM-3	HAVCR2	GCCTTCTGCAACTCCGACA	GGGCATCTTGGTGAAGCCT
Galectin-9	Galectin-9	GTGGGTGTGAAAGGCAGCGGT	TCCAGAAAAGGGGACAGCTGGA
CCR6	CCR6	CCATTCTGGGCAGTGAGTCA	TTTAGCAACTTGCACGTGGC
PVR	PVR	ACTCAGGCATGTCCCGTAAC	GTCTGTGGATCCTGGGAAGA
SOCS3	SOCS3	TCTGTGCGAAGACCGTCAAC	CCTTAAAGCGGGGCATCGTA
NRP1	NRP1	AGCAAGCGCAAGGCTAAGTC	ATCCTGATGAACCTTGTGGAGAGA
SEMA4A	SEMA4A	TCTGCTCCTGAGTGGTGATG	AAACCAGGACACGGATGAAG
IRF4	IRF4	AATCCTCGTGAAGGAGCTGA	ATCCTGCTCTGGCACAGTCT
MAfB	MAfB	AGACGCCTACAAGGTCAAGTGC	CGACTCACAGAAAGAACTCGGG
IL4I1	IL4I1	ATCTCCACCGAGAGTCATGG	GGGCTTCAGGGTCCGATTGA

M. Test de chimioattraction in vitro des mDC

Pour les expériences de chimioattraction, les mDC, tDC et DCExoC15 ont respectivement été marquées avec des fluorochromes DiO, DiD et DiL (Vybrant Multicolor Cell labeling kit, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) reprises dans du RPMI 1640 complété avec 10% de SVF clarifié, MEM 10X (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis), NaOH 1M, 7,5% NaHCO₃ et mélangées avec 1,5 mg/mL de collagène (PureCol®, Advanced Biomatrix, San Diego, CA) à la densité de 18×10^6 cellules/mL et placées dans les chambre de migration d'une lame μ -Slide chemotaxis^{3D} (Ibidi, Munich, Allemagne), en suivant les instructions du fournisseur. Les chambres de migration des μ -Slide chemotaxis^{3D} ont été chargées avec les mDC, tDC et DCExoC15. Les réservoirs de la gauche vers la droite des chambres de migration ont été remplis avec du milieu de culture (MC) (RPMI 1640, complété avec 10% de SVF clarifié). Les chimiokines CCL19 ou CCL20 (Peprotech, London, UK) (100 ng/mL) ou les ExoC15 (5 μ g/mL) ont été ajoutés dans le réservoir de droite pour générer un gradient de chimioattraction.

De la Microscopie en temps réel a été réalisée en utilisant le vidéo-microscope Zeiss (Zeiss axio observer Z1) équipé d'un objectif 10x à contraste de phase avec laser vert, rouge et rouge lointain. Les chambres de migration des μ -Slide chemotaxis^{3D} ont été chargées avec les DC ont été incubées dans l'incubateur du microscope Zeiss à 37°C et 5% de CO₂ et des images ont été prises toutes les 5 min pendant 5 à 6 heures avec le logiciel Zen (Zen blue v2.3). Le logiciel Imaris (Oxford Instrument, États-Unis, V 9.8.0) a été utilisé pour réaliser le suivi des trajectoires des cellules. Pour chaque expérience indépendante entre 40 et 50 cellules ont été suivies en excluant les cellules immobiles. Ensuite, le logiciel MATLAB (R2020a) a été utilisé pour réaliser les différentes analyses, les graphiques de migration et les tests statistiques. Les trajectoires des cellules ont toutes été extrapolées à $(x, y) = 0$ correspondant au temps 0h. L'analyse quantitative de la migration des DC a été effectuée en mesurant plusieurs paramètres des trajectoires donnant des informations sur la rapidité et la rectitude du déplacement des cellules ainsi que sur la possibilité de migration vers le gradient chimiotactique. Nous avons mesuré le centre de masse (COM), la vitesse, les indices de migration (FMI) parallèles et perpendiculaires au gradient, la directivité et le test de Rayleigh comme décrit par Ruez *et al.* (Ruez *et al.*, 2018)

- Le centre de masse (COM) représente les coordonnées moyennes de toutes les cellules en fin d'expérience pour un nombre n de cellules analysées. Ces valeurs x et y (respectivement parallèle et perpendiculaire au gradient de chimioattraction)

indiquent la direction dans laquelle le groupe de cellules s'est principalement déplacé ; ce paramètre évalue la chimioattraction.

- La vitesse représente la vitesse absolue des cellules, quelle que soit la direction. La vitesse a été calculée en divisant la distance accumulée par la durée du suivi cellulaire, pour chaque cellule. Les valeurs, exprimées en $\mu\text{m}/\text{min}$, représentent la vitesse moyenne de n cellules pour chaque condition.
- Les indices de migration (FMI) parallèles et perpendiculaires au gradient représentent l'efficacité de la migration des cellules par rapport à l'axe parallèle et perpendiculaire au gradient de chimioattraction respectivement. Les valeurs représentent les FMI parallèle et perpendiculaire moyenne de n cellules pour chaque condition ; un fort effet chimioattracteur conduit à un FMI parallèle élevé (positif ou négatif) et à un FMI perpendiculaire faible.
- La directivité représente une mesure de la rectitude de la trajectoire des cellules, quelle que soit la direction. Ce paramètre a été calculé en divisant la distance euclidienne (point de départ à point final) par la distance totale de chacune des cellules. Les valeurs représentent le caractère direct moyen de n cellules pour chaque condition. Ce paramètre n'évalue pas directement la chimioattraction, mais il peut être influencé par celle-ci.
- Le test de Rayleigh évalue la répartition uniforme ou non des cellules autour du point d'origine. L'hypothèse nulle « répartition uniforme » traduisant d'une absence de chimioattraction est rejetée avec $p < 0,05$.

N. Analyses statistiques

Le logiciel Graphpad Prism 8.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, États-Unis) a été utilisé pour le traitement des données ainsi que les analyses statistiques. Les différences statistiques entre les conditions ont été déterminées en utilisant les tests statistiques suivants : One-Way ANOVA suivi d'un test de Tukey ou un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn's. Avant de réaliser les différents tests, l'identification et l'exclusion de valeur aberrantes ainsi qu'un test de Shapiro-Wilk ont été réalisés. Les valeurs statistiques de p sont les suivantes $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), and $p \leq 0.0001$ (****) avec $p < 0.05$ considérée comme statistiquement significatif et hautement significatif pour les autres.

Résultats

RESULTATS

Partie I : Effet des exosomes tumoraux de CNP sur le développement des cellules dendritiques humaines

A. Production et caractérisation des vésicules extracellulaires

i. Production des vésicules extracellulaires de CNP

Afin de produire les vésicules extracellulaires (EVs) dérivées de CNP, nous utilisons la lignée C15. Cette lignée est issue d'une biopsie d'une jeune fille Algérienne âgée de 13 ans atteinte de métastases avancées de CNP qui a été xéno greffée en continu dans des souris NUDE permettant l'obtention de la lignée C15. La **Figure 19A** explique le protocole que nous avons mis en place pour le maintien de la lignée C15 de CNP nécessaire pour la production d'EVs. Nous avons pour cela réalisé des xéno greffes de la tumeur C15 en sous-cutanée dans des souris SCID. De façon régulière, nous avons suivi l'évolution à la fois de la masse des souris et du volume des tumeurs (**Figure 19B et C**). Toutes les 4 semaines nous avons récupéré les tumeurs par exérèse (**Figure 19A**). Une partie des tumeurs a été utilisé pour maintenir en continu la lignée C15, le restant des tumeurs a été digéré par voie mécanique puis enzymatique. Les cellules individualisées ont été mises en culture pendant 48h et les surnageants de culture ont été récupérés pour isoler les EVs. Le **Tableau 6** regroupe les données sur la masse des tumeurs, les quantités de cellules isolées et de surnageants de culture récupérés ainsi que les concentrations protéiques et particulières des EVs après isolement.

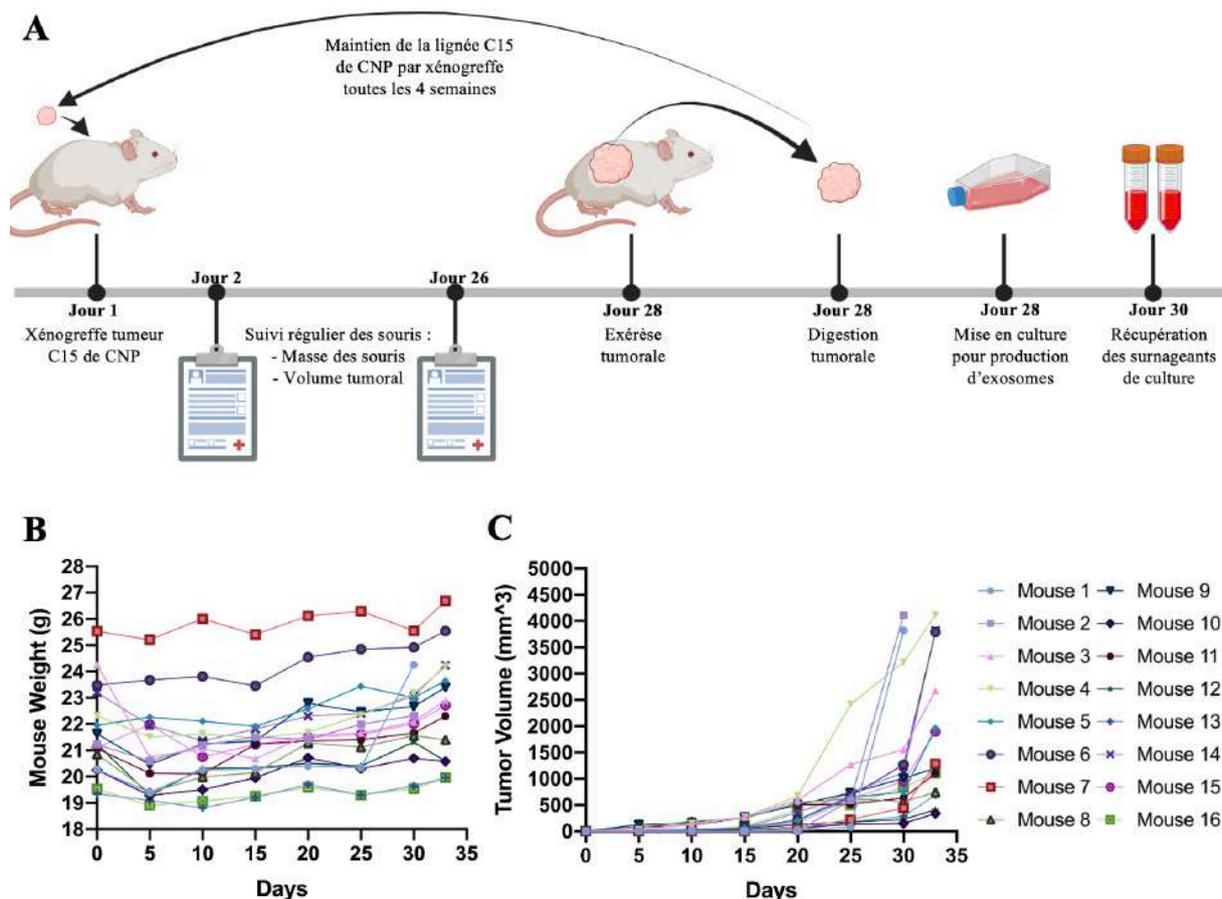


Figure 19 : Protocole d'obtention des exosomes de CNP et suivi de la prise tumorale des souris. (A) Protocole expérimental d'obtention des tumeurs et des exosomes C15 de CNP. (B et C) Suivi respectif de la masse des souris et du volume des tumeurs par mesure au pied à coulisse au cours du temps.

Tableau 6 : Caractéristiques concernant la production des EVs.

Masse tumorale (g)	Nombre de cellules isolées	Volume de surnageants (mL)	Concentration protéique en Exosomes (µg/mL)	Concentration en Exosomes (particules/mL)
5,09 ± 1,86	1,47E+08 ± 7,46E+07	220,5 ± 111,9	715,65 ± 229,03	5,75E+11 ± 3,75E+11

Ce tableau fournit des informations sur la masse des tumeurs après exérèses, le nombre de cellules après digestion des tumeurs, la quantité de surnageant récupéré pour l'isolement des EVs ainsi que la concentration en protéines et en particules des EVs après isolement.

ii. Caractérisation morphologique et phénotypique des EVs

Suite à la production des EVs, nous avons réalisé une caractérisation morphologique et phénotypique afin de montrer que nous travaillons sur des petites EVs (SEVs) et plus particulièrement sur des exosomes (Exo) (**Figure 20**). Pour cela, nous avons tout d'abord analysé la taille des EVs par microscopie électronique après un contraste au PTA (**Figure 20A**). Cette analyse des EVs indique une taille moyenne de 95,6 nm (+/- 34,6nm). Parallèlement, nous avons analysé la répartition de taille des EVs par la méthode TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing). Cette méthode permet un dénombrement précis de vésicules extracellulaires et donne une répartition de leur taille nous aidant à déterminer l'homogénéité de notre échantillon (**Figure 20 B**). Les échantillons d'EVs C15 font entre 60 et 200 nm de diamètre avec une taille moyenne de 99 nm (+/- 52,57 nm) et une taille médiane de 72,8 nm (+/- 9,13 nm). Ainsi, ces analyses confirment que les EVs isolées correspondent à des SEVs.

Ensuite par Western Blot, nous avons vérifié que ces SEVs exprimaient bien les marqueurs moléculaires caractéristiques des exosomes (**Figure 20C**). Les marqueurs communs aux exosomes, CD63 et HLA-DR sont trouvés enrichis, avec HLA-DR étant fortement présent dans les SEVs C15 (**Figure 20C**). De plus, nous avons observé la présence du marqueur endosomal TSG-101 comme attendu pour les SEVs C15. Nous avons ensuite vérifié la présence de marqueurs protéiques caractéristiques des SEVs de CNP telles que les protéines LMP1 et Galectine-9 (Gal-9) qui sont toutes deux exprimées par les cellules C15 de CNP et présentes sur les SEVs dérivées de cette lignée tumorale (**Figure 20C**).

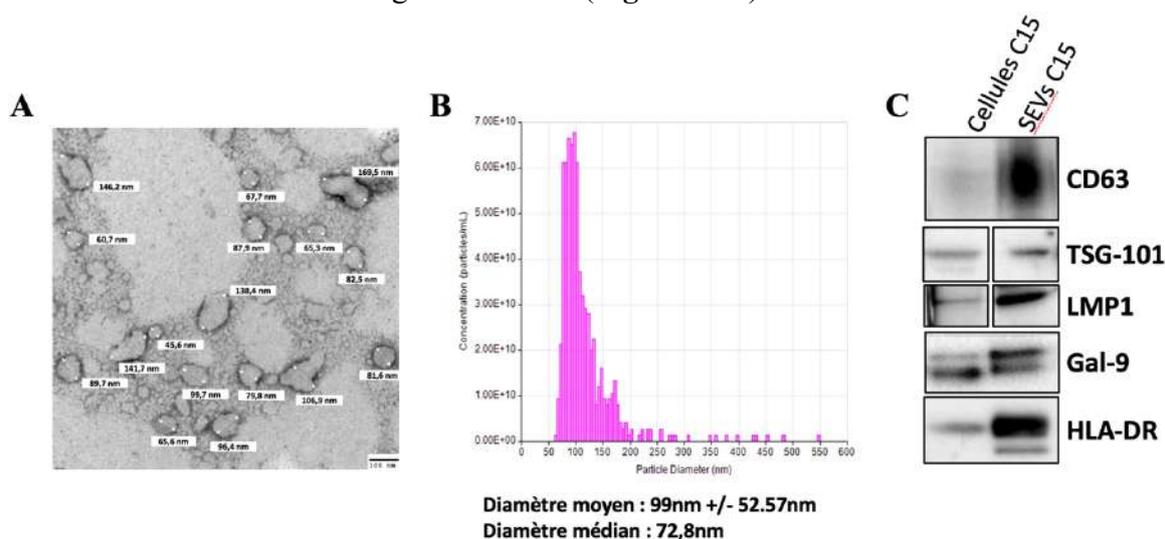


Figure 20 : Caractérisation des exosomes de la lignée C15 de CNP. Analyse morphologique des vésicules extracellulaire (EVs) par microscopie électronique après contraste avec 2% d'acide phosphotungtique (PTA) (**A**), par analyse de leur taille et concentration par TRPS (**B**). **C**. Western Blot représentatif des protéines CD63, TSG-101, LMP1, Galectine-9 (Gal-9) et HLA-DR sur les cellules de la lignée C15 ainsi que sur les SEV C15.

Toutes ces analyses morphologiques et phénotypiques ont permis de confirmer que les EVs isolées à partir des surnageants de culture de la lignée C15 de CNP sont des SEVs et plus particulièrement des exosomes. Pour la suite de ce manuscrit, nous les dénommerons exosomes C15 (ExoC15).

iii. Caractérisation fonctionnelle des ExoC15

Les exosomes de CNP ont été décrit par Klibi *et al.* comme étant immunosuppresseurs et ainsi capables de supprimer la prolifération des cellules immunitaires (Klibi *et al.*, 2009). De ce fait, pour vérifier les effets immunosuppresseurs des ExoC15, nous avons réalisé un test de prolifération de PBMC humains en leur présence ou non (**Figure 21**). Les PBMC humains ont été activés et mis en co-culture avec les ExoC15 à deux concentrations 0,5 µg/mL et 5 µg/mL et nous avons mesuré la prolifération après 72h de culture. La **Figure 21** nous montre les résultats de ce test sur lequel nous pouvons observer qu'en présence d'ExoC15 à 5 µg/mL, la prolifération des PBMC humains est significativement diminuée d'environ 30% par rapport à la condition contrôle PBMC activés.

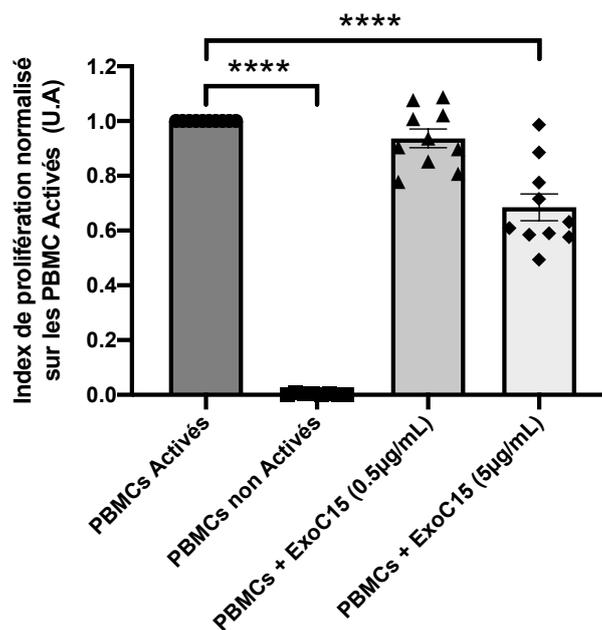


Figure 21 : Propriété immunosuppressive des exosomes C15 de CNP. Les propriétés immunosuppressives des ExoC15 ont été testées par le biais d'un test de prolifération. Les PBMC non activés ont été utilisés comme contrôle négatif de prolifération et les PBMC activés comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en index de prolifération normalisés sur la condition contrôle PBMC activés, moyenne \pm SEM, n=10. Les différences statistiques entre la condition PBMC activés et les autres conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA, ****p<0,0001.

Ainsi, les différentes caractérisations, morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles des exosomes isolés ont démontré qu'ils répondaient bien aux critères des exosomes en terme de taille, de présence de marqueurs moléculaires caractéristiques, ainsi que de fonction immunosuppressive, comme précédemment décrits (Klibi *et al.*, 2009). A noter que pour chaque production d'exosomes, une caractérisation phénotypique complète n'est pas possible en raison des quantités limitées que nous obtenons. En revanche, les tests fonctionnels des exosomes tumoraux ont systématiquement été réalisés sur au moins trois donneurs indépendants avant leur utilisation expérimentale.

B. Caractéristiques fonctionnelles, phénotypiques et métaboliques des cellules dendritiques générées en présence des ExoC15

i. Génération des DC dérivées de monocytes en présence d'ExoC15

Après la caractérisation des ExoC15, nous avons pu les mettre en œuvre pour caractériser leur effet sur le développement des cellules dendritique humaines. Brièvement, nos DC sont générées à partir de monocytes (moDC) issus des PBMC de donneurs sains (**Figure 22**). Dans le but de différencier les monocytes en DC immature (iDC), nous avons classiquement ajouté du GM-CSF et de l'IL-4 aux cultures pendant 5 jours. Les iDC ont ensuite été maturées en DC matures (mDC) par l'ajout de TNF- α et d'IL-1 β ou en DC tolérogènes (tDC) par l'ajout supplémentaire de dexaméthasone et de vitamine D3 pendant 2 jours. Enfin, pour générer les DC en présence d'ExoC15 (DCExoC15), les exosomes ont été ajouté en culture avec les monocytes au jour 0 (**Figure 22**) avec du GM-CSF et de l'IL-4 pendant 5 jours puis avec du TNF- α et de l'IL-1 β pour la phase de maturation. Les DC obtenues après la différenciation et la maturation ont été récupérées pour des analyses fonctionnelles, phénotypiques, transcriptionnelles et métaboliques.

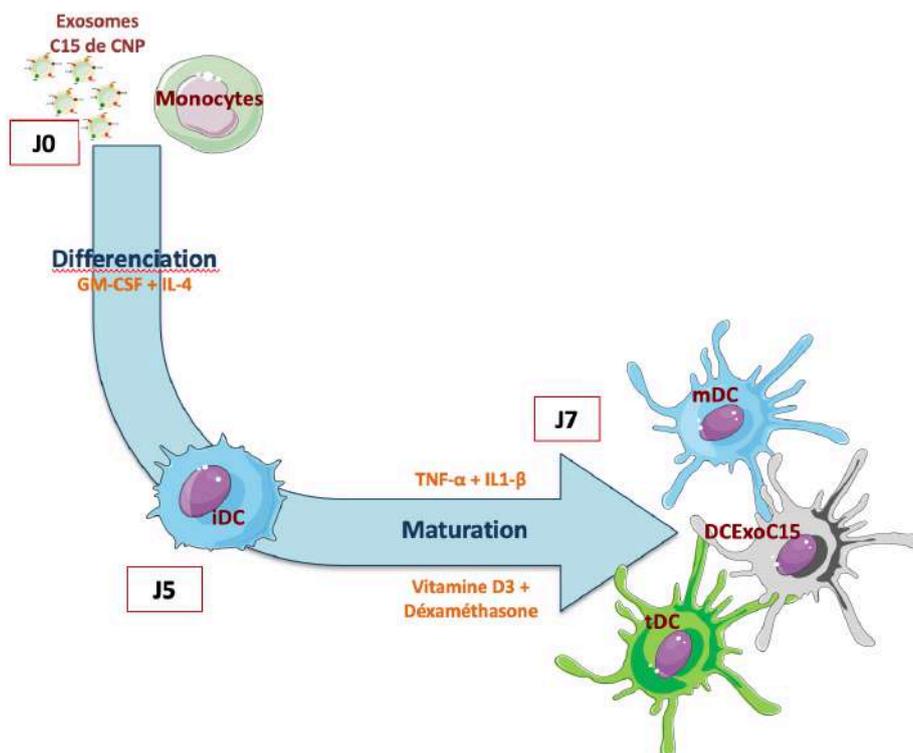


Figure 22: Protocole expérimental d'obtention des moDC à partir des monocytes humains. Les monocytes sont mis en culture au jour 0 (J0) en présence ou non d'exosomes C15 de CNP et différenciés pendant 5 jours en DC par l'ajout de GM-CSF et d'IL-4. Ensuite, pendant 2 jours, les iDC obtenues sont maturées en mDC par l'ajout de TNF- α et d'IL-1 β ou en tDC par l'ajout supplémentaire de vitamine D3 et de dexaméthasone. Enfin, pour la condition avec les exosomes C15 de CNP, nous ajoutons du TNF- α et de l'IL-1 β comme pour les mDC. Les cellules à J5 et J7 sont utilisées ensuite pour les différentes expériences permettant l'étude des fonction activatrice ou régulatrices des DC ainsi que leur phénotype, leur sécrétion cytokinique et leur métabolisme.

ii. Propriétés immunosuppressives des DC générées avec les ExoC15

Afin d'évaluer le potentiel activateur des DCExoC15, nous avons testé leur fonction activatrice par un test de prolifération en co-culture avec des LT CD3⁺ totaux hétérologues. Pour cela nous avons récupéré les différentes moDC (iDC, mDC, tDC et DCExoC15) à l'issue des 7 jours de culture nous les avons mis en co-culture (après irradiation) avec des LT CD3⁺ pour mesurer la prolifération des LT CD3⁺ après 48h, 72h et 96h (**Figure 23**). Le test de prolifération montre qu'après 48, 72 et 96h de co-culture, les mDC augmentent la prolifération des LT CD3⁺ en comparaison avec les iDC et les tDC contrôles (**Figure 23 A, B et C**). De façon intéressante, les DCExoC15 diminuent significativement la prolifération des LT CD3⁺ dès 48h de co-culture avec 42,8 % de prolifération en moins que les mDC contrôle (**Figure 23 A**). Cette baisse de prolifération des LT CD3⁺ est maintenue après 72h et 96h de co-culture avec respectivement 36,4% et 38,4% de prolifération en moins que les mDC (**Figure 23 B et C**).

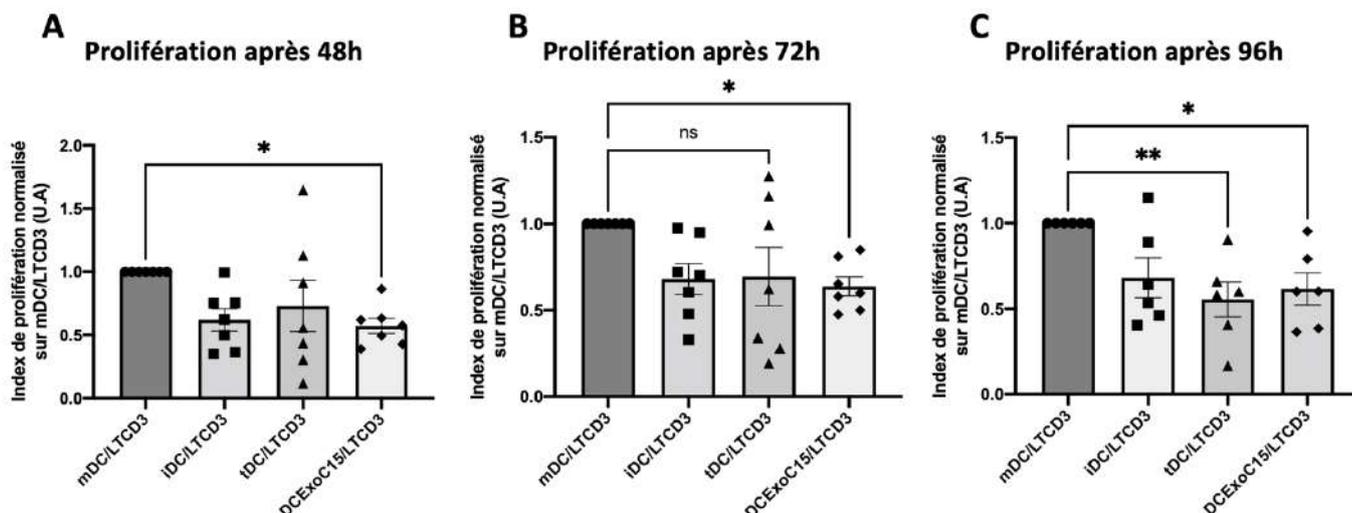


Figure 23 : Fonction suppressive des DC générées avec les exosomes C15 de CNP. Test de prolifération des LT CD3⁺ en co-culture avec les iDC, mDC, tDC et DCExoC15 après 48h (A), 72h (B) et 96h (C). Les résultats sont exprimés en index de prolifération normalisée sur la condition mDC/LTCD3, moyenne \pm SEM, n=7 (48 et 72h) et n=6 (96h). Les différences statistiques entre la condition mDC/LTCD3 et les autres conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA, *p<0,05, **p<0,01.

Ces résultats montrent que les DCExoC15 ont une fonction suppressive toléro-gène en régulant l'activation des LT. Les ExoC15 impactent donc la fonction des DC favorisant une fonction régulatrice plutôt qu'activatrice.

iii. Étude du phénotype des DC générées en présence des ExoC15

Dans le but de déterminer si les modifications fonctionnelles observées précédemment sur les DCExoC15 étaient dues à des changements dans leur phénotype, nous avons réalisé une étude phénotypique des moDC par cytométrie en flux en regardant différents marqueurs membranaires après la phase de différenciation (J5) (Figure 24) et de maturation (J7) (Figure 25).

a) Impact des ExoC15 sur la différenciation des moDC

A l'issue de la phase de différenciation, nous avons comparé l'expression du marqueur myéloïde CD11, du marqueur monocyttaire CD14 et de la lectine DC-SIGN entre les monocytes et les différentes moDC (iDC, tDC et DCExoC15) (Figure 24). L'analyse du niveau d'expression des marqueurs montre que les moDC (iDC, tDC et DCExoC15) se sont bien différenciées, ce qui est visible par la perte d'expression du CD14 et l'augmentation d'expression de la lectine DC-SIGN en comparaison avec les monocytes (Figure 24 A et B).

Cependant, lors de la comparaison d'expression des marqueurs membranaires entre les iDC, tDC et les DCExoC15, nous n'avons pas observé de différences significatives.

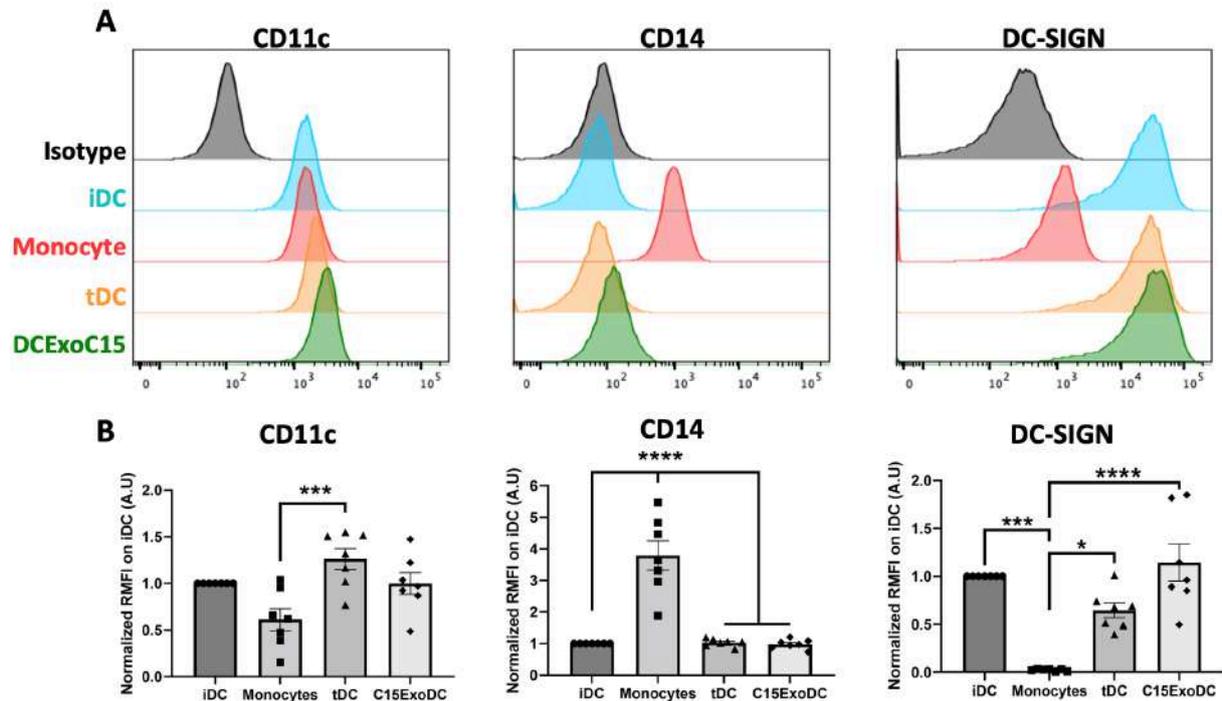


Figure 24 : Caractérisation phénotypique des moDC après la différenciation par cytométrie en flux. (A) Niveau d'expression des marqueurs membranaires de surface CD11c, CD14 et DC-SIGN dans les iDC (Bleu), monocytes (rouge), tDC (orange) et DCExoC15 (vert) après différenciation. L'isotype contrôle apparaît en noir. Les graphiques sont représentatifs de sept expériences indépendantes. (B) Histogrammes des niveaux de florescences des marqueurs membranaires de surface CD11c, CD14 et DC-SIGN dans les iDC, monocytes, tDC et DCExoC15. Les histogrammes sont représentatifs de sept expériences indépendantes exprimés en médiane de fluorescence normalisées sur les iDC, moyenne \pm SEM, n=7. Les différences statistiques entre les iDC et les autres cellules (monocytes, tDC et DCExoC15) ont été analysées par un test One-Way ANOVA après identification des outlier. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

b) Impact des ExoC15 sur la maturation des moDC

Après le processus de maturation, les iDC, mDC, tDC et DCExoC15 ont été analysées pour l'expression des marqueurs CD11c, CD14, des marqueurs de co-stimulation (CD40, CD80, CD83, CD86), de présentation antigénique (HLA-DR) et du marqueur des iDC DC-SIGN (Figure 25). L'analyse de l'expression des marqueurs de co-stimulation et de présentation antigénique des moDC indique que les mDCs expriment beaucoup plus de CD40, CD80, CD83, CD86 et HLA-DR que les iDCs (respectivement 54%, 73%, 84% 88% et 75% de plus) confirmant leur état mature (Figure 25). De même, les tDC expriment significativement moins tous les marqueurs de costimulation analysés (Figure 25) et présentent un profil similaire aux iDC, à l'exception de DC-SIGN qui est moins exprimé. Concernant les DCExoC15, lorsque nous

comparons l'expression des marqueurs de surface à celle des mDC, nous n'observons pas de modification significative de leur expression (**Figure 25**).

A.

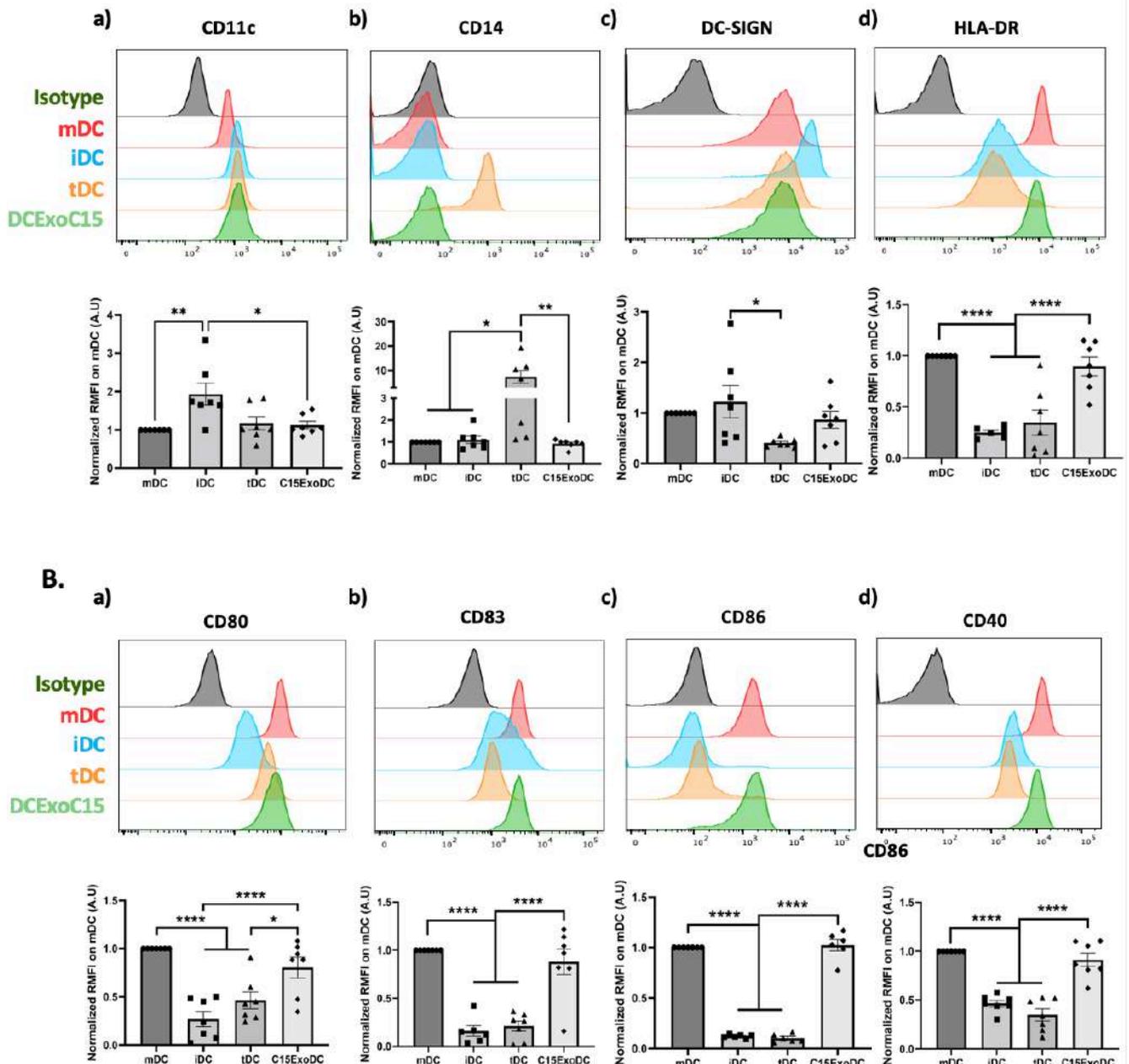


Figure 25 : Caractérisation phénotypique des moDC après la maturation. Niveau d'expression des marqueurs membranaires de surface CD11c, CD14, DC-SIGN, HLA-DR (**A.a-d**) et CD80, CD83, CD86 et CD40 (**B.a-d**) dans les mDC (rouge), iDC (bleu), tDC (orange) et DCExoC15 (vert) après maturation. L'isotype contrôle apparaît en noir. Les graphiques sont représentatifs de sept expériences indépendantes. Les histogrammes des niveaux de fluorescence des différents marqueurs membranaires de surface dans les moDC apparaissent sous chaque graphique de fluorescence. Les histogrammes sont représentatifs de sept expériences indépendantes exprimés en médiane de fluorescence normalisée sur les mDC, moyenne \pm SEM $n=7$. Les différences statistiques entre les mDC et les autres cellules (iDC, tDC et DCExoC15) ont été analysées par un test One-Way ANOVA après identification des outliers. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

Ainsi, ces résultats montrent que les ExoC15 ne modifient pas l'expression des molécules de co-stimulation et de présentation antigénique dans les DC générées, confirmant le maintien de leur fonction présentatrice d'antigènes. Par conséquent, le défaut d'activation des LT observé (Figure 23) n'est pas dû à une modification du phénotype.

iv. Étude transcriptomique des DCExoC15 après maturation

Les résultats précédents montrent que les DCExoC15 ont le même profil d'expression des marqueurs protéines membranaire que les mDC contrôles. Pour pousser un peu plus en détail la caractérisation phénotypique de ces DCExoC15, nous avons examiné l'expression de gènes associés à la maturation ou aux propriétés de régulation dans les moDC (Figure 26). L'analyse en Heat map de l'expression des gènes associés à la maturation (Figure 26 A) montre que les tDCs expriment moins CCR7, CD36, DC-LAMP et FOXO1 par rapport au mDC. L'analyse quantitative de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Figure 26 B) a confirmé que les tDCs expriment moins de CCR7, DC-LAMP et FOXO1 que les mDCs. Pour les C15ExoDC, nous n'observons pas de différences significatives dans l'expression des gènes liés à la voie de maturation par rapport aux mDCs (Figure 26 B). En ce qui concerne les gènes associés à la régulation (Figure 26 C), les tDC semblent exprimer davantage TSC22D3, LILRB4, LILRB2, HAVCR2, CCR6, SOCS3, NRP1, SEMA4A et moins exprimer CD36, IDO, CD274 et PDCL1LG2 par rapport aux mDCs. La surexpression de TSC22D3 est confirmée par une analyse quantitative ainsi que la sous expression de CD36, IDO, CD274 et PDCL1LG2 (Figure 26 D). De manière identique, les C15ExoDC expriment statistiquement moins d'IDO, de CD274 que les mDC. De plus, les C15ExoDC semblent exprimer de façon plus importante, LILRB4, LILRB2, HAVCR2, CCR6, NRP1 et SEMA4A que les mDC mais de façon non significative.

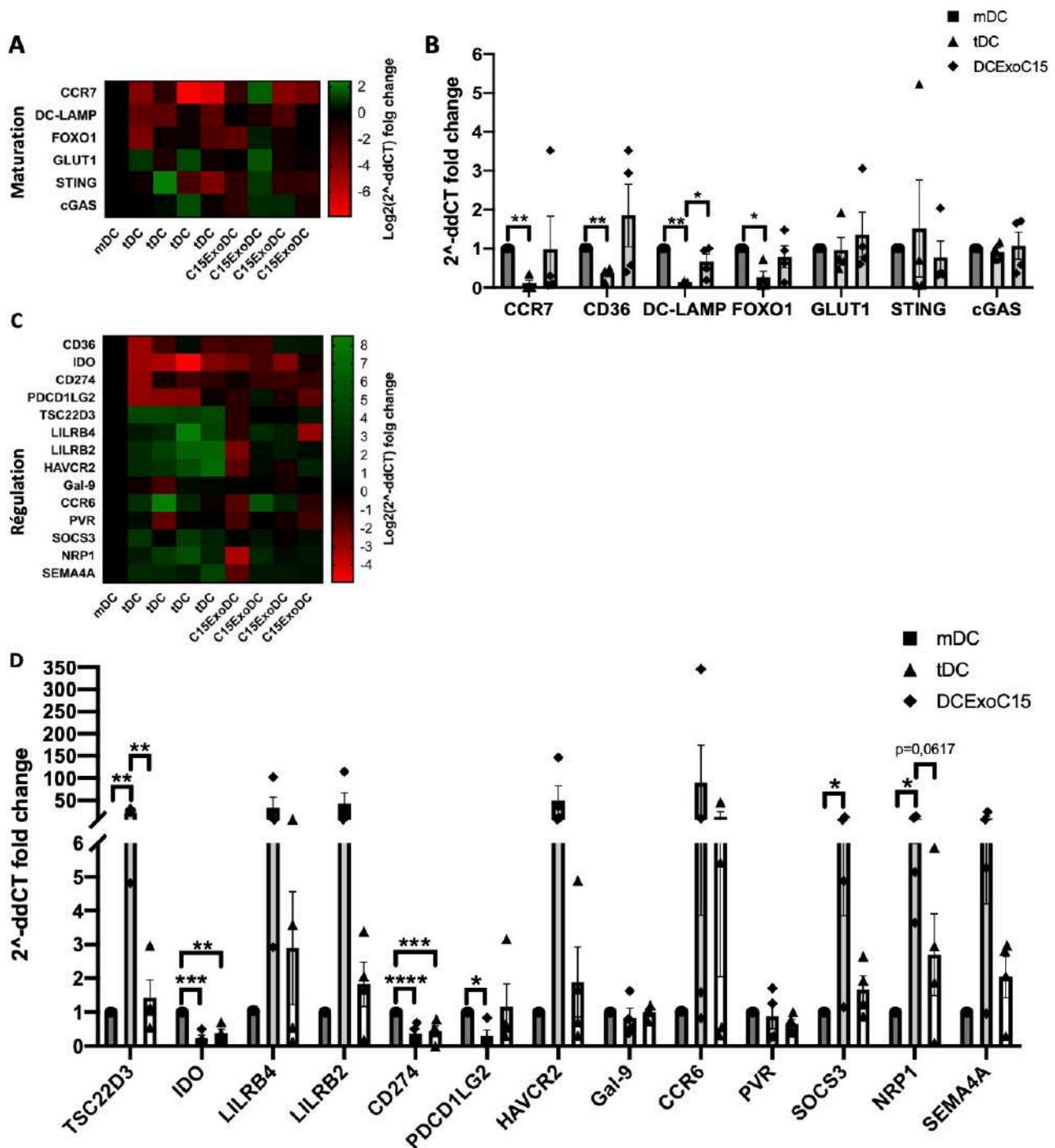


Figure 26 : Expression de gènes associés à la voie d'activation ou de régulation dans les moDC. (A et C) Heat map représentant les niveaux d'expression des gènes associées aux propriétés de maturation (A) ou de régulation (C) dans toutes les moDC (mDC, tDC et DCExoC15) issues de 4 expériences indépendantes. Les Heat map sont exprimées en $\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$ normalisé sur les mDC contrôles. Les gènes surexprimés sont représentés en vert tandis que les sous-expressions sont en rouge comme indiqué par l'échelle à droite des Heat map. (B et D) Histogrammes représentant l'expression en $2^{-\Delta\Delta CT}$ des gènes associées aux propriétés de maturation (B) ou de régulation (D) dans toutes les moDC (mDC, tDC et DCExoC15). Les données sont représentatives de quatre expériences indépendantes normalisées par rapport à l'expression des gènes dans la condition mDC contrôles, moyenne \pm SEM n=4. Les différences statistiques ont été analysées par un test One-Way ANOVA ou par un test de Kruskal-Wallis. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Les résultats de RT-qPCR montrent que les DCExoC15 présentent une expression des gènes associés à la maturation des DC proche de celle des mDC. Concernant les gènes associés à la régulation IDO et PD-L1 (CD274), ceux-ci sont significativement moins exprimés que ceux exprimés dans les mDC. Inversement les gènes codant LILRB4, LILRB2, HAVCR2, CCR6, NRP1 et SEMA4A semblent être plus exprimés montrant un profil d'expression mixte entre mature et tolérogène.

v. Propriétés immunorégulatrices des DCExoC15 *via* le sécrétome

Afin de comprendre par quels mécanismes les DCExoC15 obtiennent leur fonction tolérogène, la sécrétion de cytokines par les moDCs et l'activité de l'enzyme indoléamine 2,3 dioxygénases (IDO) ont été suivies après les phases de différenciation (**Figure 27**) et de maturation (**Figure 28** et **Figure 29**).

a) Mécanismes d'immunorégulation durant la différenciation des moDC

Après la phase de différenciation, nous avons dosé par ELISA la production des cytokines effectrices IL-12p70, IL-6 ainsi que les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β (**Figure 27 A**) à partir des surnageants de culture de toutes les moDC. Concernant les cytokines effectrices, nous avons observé une faible sécrétion d'IL-12p70 (entre 3,9 et 10 pg/ml) par les différentes cellules (**Figure 27 A1**). De façon intéressante, nous remarquons que les DCExoC15 produisent significativement plus d'IL-6 que les autres cellules après la différenciation (**Figure 27 A2**). En ce qui concerne les cytokines immunosuppressives, le TGF- β est faiblement sécrété par les cellules (environ 20 pg/ml) (**Figure 27 A3**). De plus, les DCExoC15 montrent une augmentation significative de la sécrétion d'IL-10 par rapport aux autres cellules (environ 10 fois plus) (**Figure 27 A4**). Une autre caractéristique des tDC est l'expression de l'enzyme immuno-régulatrice IDO qui joue un rôle important dans l'immunorégulation. Lorsqu'IDO est active, elle induit la métabolisation du tryptophane en kynurénine, parmi d'autres produits. La déplétion du tryptophane rend anergique les LT effecteurs et le kynurénine induit leur apoptose. Ainsi l'expression de l'IDO a été déterminée dans les moDCs par Western Blot et l'activité biologique de cette enzyme a été évaluée par dosage HPLC de son substrat et de ses produits (Tryptophane (Trp) et Kynurénine (Kyn) respectivement) après le processus de différenciation (**Figure 27 B**). L'analyse protéique d'IDO par Western Blot montre que les tDCs contrôles expriment 30% moins d'IDO que les iDCs (**Figure 27 B1**). De manière surprenante, les DCExoC15 ont la plus forte expression d'IDO qui

est respectivement 2,7 et 3,9 fois plus importante que les contrôles iDCs et tDCs (**Figure 27 B1**). Parallèlement, nous avons mesuré par HPLC le rapport Kynurénine/Tryptophane et nous observons que les DCExoC15 sécrètent significativement plus de Kynurénine que de Tryptophane par rapport aux iDCs et tDCs contrôles (approximativement 1,55 fois plus) (**Figure 27 B2**).

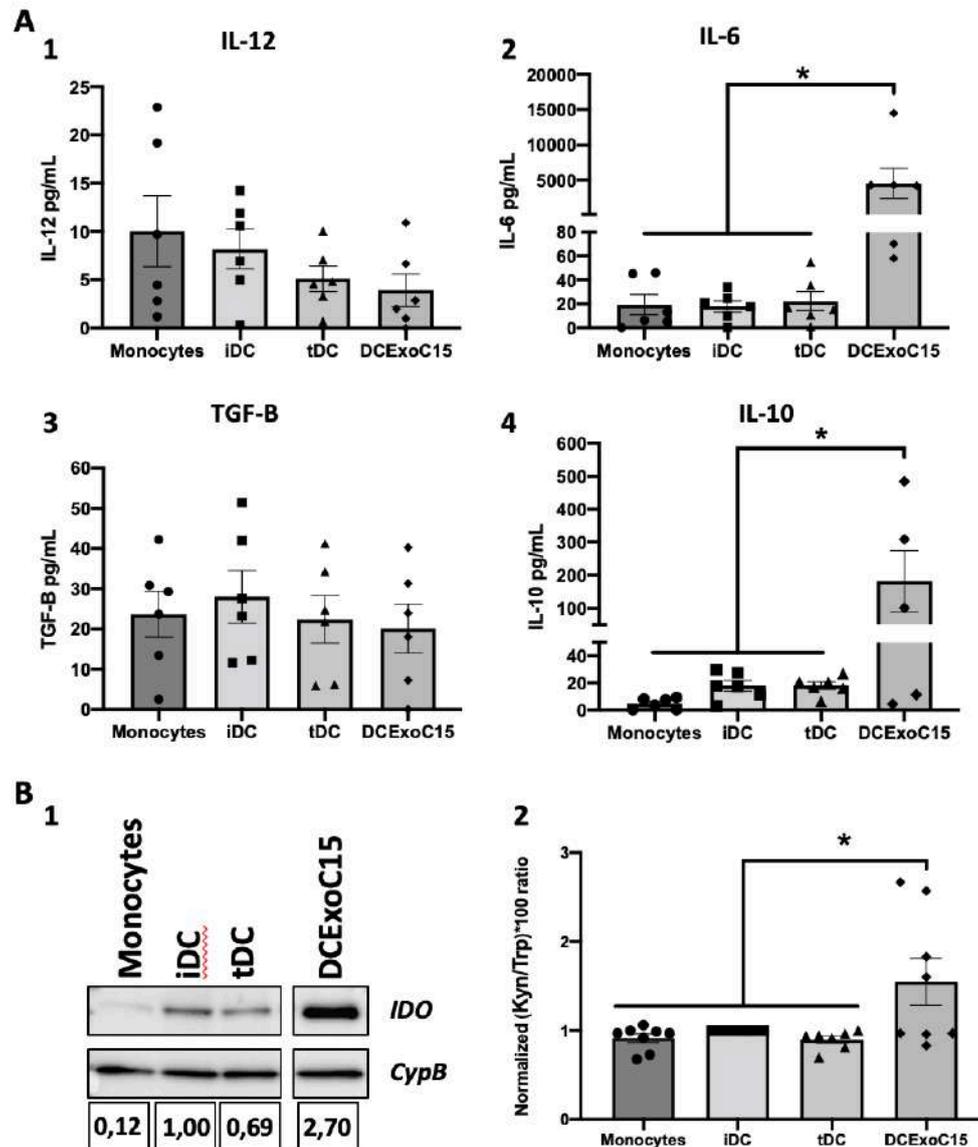


Figure 27 : Dosage des cytokines sécrétées par les moDC et étude de l'enzyme IDO après différenciation. (A) Dosage de la sécrétion des cytokines par ELISA dans le surnageant de culture des monocytes et des MoDCs. (A1-2) Sécrétion des cytokines proinflammatoires IL-12 et IL-6, (A3-4) dosage des cytokines immunosuppressives TGF-β et IL-10. Les résultats sont exprimés en concentration de cytokines (pg/mL), moyenne ± SEM. (B) Expression de l'IDO sur les DCs et dosage par HPLC des métabolites du Tryptophane. (B1) Test de l'expression d'IDO par Western Blot (n=1). Les intensités des bandes d'IDO ont été quantifiées *via* le logiciel ImageJ et normalisées par rapport au contrôle Cyclophiline B (CycloB) puis normalisées par rapport au contrôle iDC. (B2) Dosage par HPLC du Tryptophane et de la Kynurénine. Les résultats sont exprimés en ratio (Kyn/Trp) x100 normalisé sur iDC. Toutes

les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA après identifications des outlier. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

b) Modification des propriétés activatrices des moDC après maturation

Les mêmes expériences ont été réalisées après la phase de maturation (**Figure 28**). Les cytokines effectrices IL-12p70 et IL-6 ainsi que les cytokines immunorégulatrices IL-4, TGF- β et IL-10 ont été dosées par ELISA à partir des surnageants de cultures des moDC (**Figure 28**). Après la maturation, nous mesurons de grande concentration d'IL-12p70 et d'IL-6 pour les mDC (respectivement $94,16\text{pg/mL} \pm 29$ and $10\ 803,2\text{pg/mL} \pm 3165,3$) ainsi qu'une grande concentration d'IL-6 pour les tDC $7805\text{pg/mL} \pm 1782,7$) (**Figure 28 A et B**). En revanche, les DCExoC15 sécrètent significativement moins de cytokines proinflammatoires IL-12p70 et IL-6, respectivement 5,57 et 7,47 fois moins en comparaison aux mDC contrôle (**Figure 28 A et AB**). Concernant les cytokines immunosuppressives, nous avons étudié la production de l'IL-4, de TGF- β et d'IL-10. Les résultats montrent que les DCExoC15 sécrètent significativement plus d'IL-4 en comparaison aux mDC et tDC contrôles (**Figure 28 C**). Cependant les DCExoC15 ne produisent pas plus de TGF- β et d'IL-10 que les mDC (**Figure 28 D et E**). Seules les tDC contrôles sécrètent des quantités importantes d'IL-10 en accord avec ce qui est attendu.

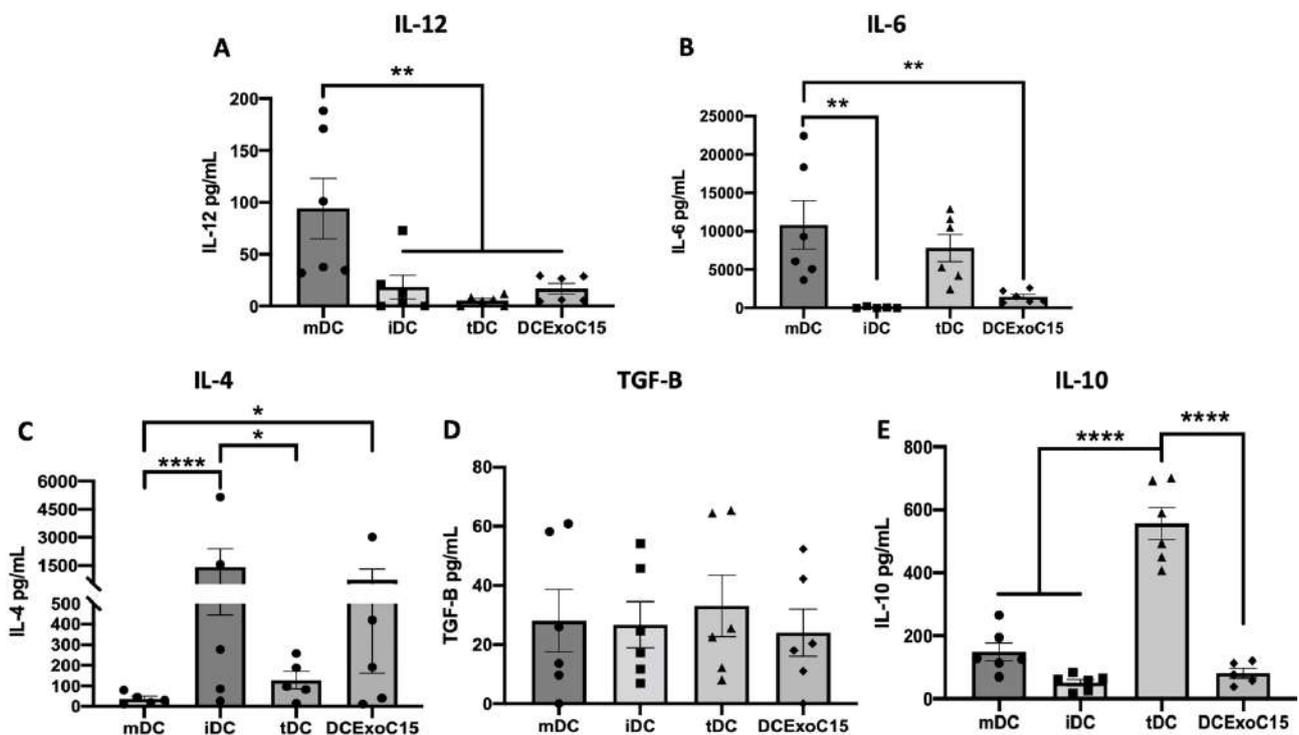


Figure 28 : Dosage des cytokines sécrétées par les moDC après la maturation. (A-E) Dosage respectif de la production d'IL-12p70, d'IL-6, d'IL-4, de TGF- β et d'IL-10 par les

moDC. Les résultats sont exprimés en concentration de cytokines (pg/mL), moyenne \pm SEM. Toutes les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA après identification des outliers. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Parallèlement aux dosages des cytokines proinflammatoires et immunosuppressives, nous nous sommes intéressés à l'expression et l'activité des enzymes IDO et IL4I1 (interleukin-4-induced gene 1) à l'issue de la maturation des moDC (**Figure 29**). De façon intéressante, après la phase de maturation, les DCExoC15 expriment significativement moins l'enzyme IDO par rapport aux mDC contrôles (**Figure 29 A1**). Par Western Blot nous observons une présence d'IDO dans les DCExoC15 proche de celle des mDC (**Figure 29 A2**). De plus, les dosages par HPLC montrent que l'activité d'IDO est deux fois moins importante pour les DCExoC15 et iDC par rapport aux mDC (**Figure 29 A3**). Aucune différence statistique n'a été observée entre les tDC et les DCExoC15 pour la production de kynurénine et de tryptophane.

Hormis IDO catabolisant le tryptophane, il a été décrit par Sadik *et al* que le gène 1 induit par l'interleukine 4 (IL4I1), une enzyme sécrétée appartenant à la famille des L-amino-acides-oxydases, est capable de promouvoir la capacité d'immunosuppression du cancer induite par les récepteurs des aryl-hydrocarbures (AHR) de manière plus puissante que l'IDO1, reconnues jusqu'à présent comme les principales enzymes cataboliques du Trp (Sadik *et al.*, 2020). Il est connu qu'IL4I1 active AHR *via* la génération d'oncométabolites tels que l'acide kynurénique (KynA), l'indole acide acétique (IAA) et l'indole acide lactique (ILA) à partir du Trp (**Figure 29 B1**). Ainsi, nous avons analysé l'expression et la production d'IL4I1 (**Figure 29 B2 et B3**). Nous observons que l'IL4I1 est exprimé de façon similaire entre les mDC, tDC et les DCExoC15 (**Figure 29 B2**). De même, le dosage de l'enzyme par ELISA montre une production de l'IL4I1 par les DCExoC15 similaire à celle des mDC et significativement plus importante que celle des tDC (**Figure 29 B3**). Enfin, nous avons mesuré par HPLC la quantité des métabolites acide kynurénique, indole acide acétique et indole acide lactique à partir des surnageants des moDC (iDC, mDC, tDC et DCExoC15) (**Figure 29 B**). Nous pouvons observer que les mDC semblent produire plus d'acide kynurénique que les iDC et produisent significativement plus d'indole acide lactique que les iDC et tDC (**Figure 29 B1 et B3**). En revanche, l'indole acide acétique est présent de façon similaire dans les surnageants des moDC. Concernant les DCExoC15, nous remarquons une production des différents métabolites identique aux mDC (**Figure 29 C1, C2 et C3**).

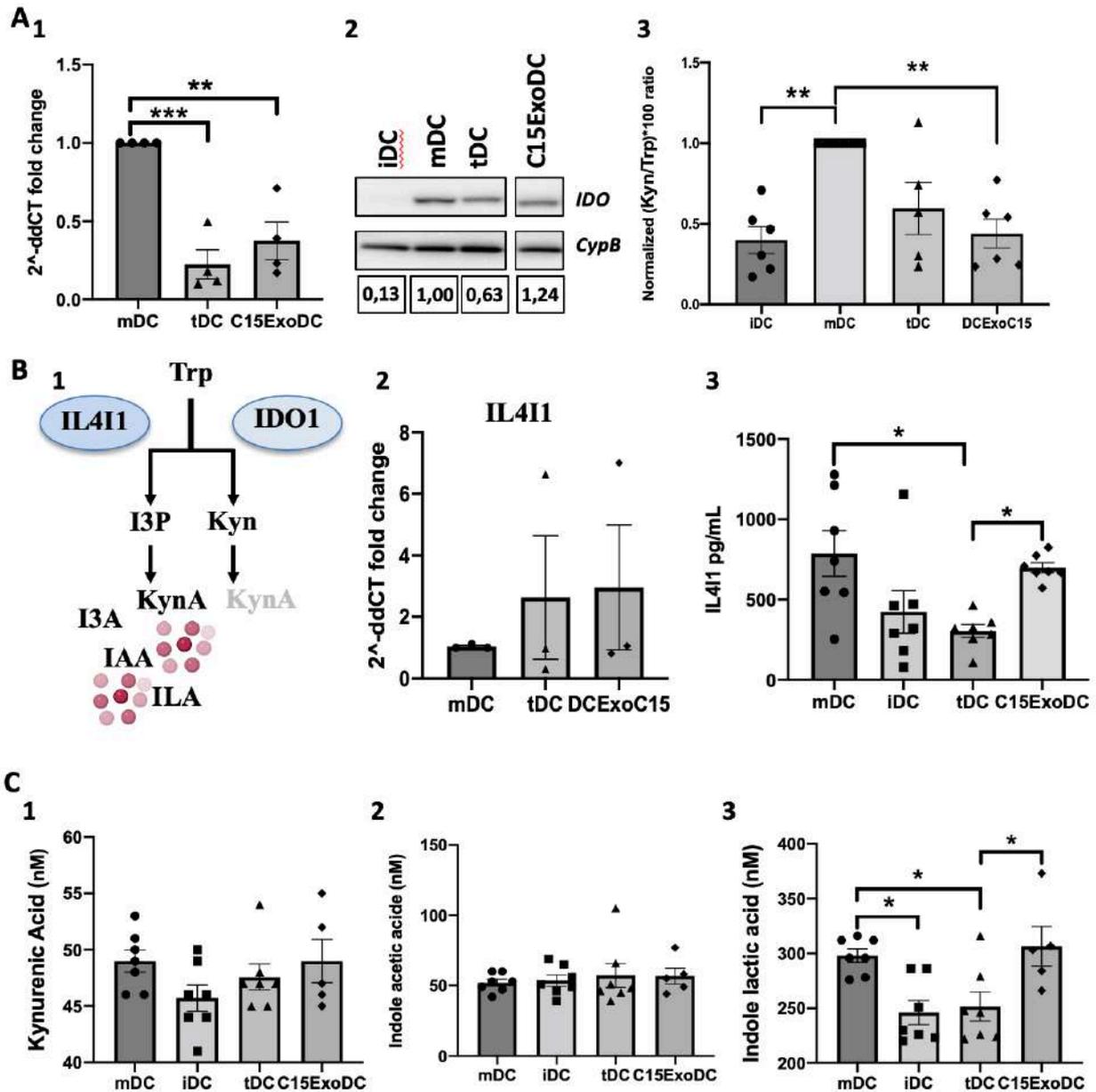


Figure 29 : Étude des enzymes IDO et IL4I1 après maturation des moDC. (A.1) Test de l'expression d'IDO par Western Blot (n=1). Les intensités des bandes d'IDO ont été quantifiées via le logiciel ImageJ et normalisées par rapport au contrôles Cyclophiline B (CycloB) puis normalisées par rapport au contrôle iDC. (A.2) Dosage par HPLC du Tryptophane et de la Kynurénine. Les résultats sont exprimés en ratio (Kyn/Trp) x100 normalisé sur mDC. (B.1) Analyse par RT-qPCR de l'expression d'IDO et d'IL4I1 dans les mDC, tDC et DCExoC15. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes normalisées par rapport à l'expression des gènes dans la condition mDC contrôles, moyenne ± SEM n=3. (B.2) Dosage par ELISA de l'enzyme IL4I1 dans les moDC. Histogramme représentatif de sept expériences indépendantes, moyenne ± SEM n=7. Toutes les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un T-test appariés après identification des outliers. (B.3) Représentation de la voie du tryptophane (Trp). Le Trp peut être métabolisé par IDO1 donnant de la kynurénine (Kyn) qui donnera peu d'acide kynurénique (KynA). Parallèlement, le Trp métabolisé par l'IL4I1 se transformant en Indole-3-acide pyruvique (I3P). Cette enzyme peu stable est catabolisée en 3 oncométabolites l'acide kynurénique (KynA), l'indole acide acétique (IAA) et l'indole acide lactique (ILA). (C) Dosage par HPLC de l'acide kynurénique (C.1), de l'indole

acide acétique (C.2) et lactique (C.3). Toutes les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-way Anova ou par un test de Kruskal-Wallis après identification des outliers. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

L'ensemble des résultats relatif à la sécrétion des cytokines par les DC montrent que précocement (au cours de la différenciation), les DCExoC15 ont un profil cytokinique régulateur avec une sécrétion d'IL-10 et une activité importante d'IDO. Puis, suite à la maturation, ont été observé un défaut de production des cytokines proinflammatoire IL-12 et IL-6. En parallèle, une production importante de la cytokine IL-4 est observée par les DCExoC15 pouvant expliquer le défaut de sécrétion d'IL-12, de l'expression d'IDO ainsi que du défaut d'activation des LT observé Figure 23.

vi. Effet des ExoC15 sur le métabolisme des DC générées en leur présence

Nos données ont démontré que les DCExoC15 ont des propriétés tolérogènes et ne sont pas capables d'activer correctement les LT. Le processus de maturation nécessite des adaptations métaboliques importantes pour permettre la survie des DC, leur migration et l'activation de l'immunité spécifique. Pour vérifier si les DCExoC15 ont des modifications dans leur métabolisme par rapport aux DC contrôles, nous avons analysé la phosphorylation oxydative (OXPHOS) ainsi que la glycolyse des mDC, tDC et DCExoC15.

a) Métabolisme oxydatif mitochondriale des moDC

Pour étudier les variations du métabolisme oxydatif, nous avons mesuré le taux de consommation d'oxygène (OCR) en temps réel des moDCs (mDC, tDC et DCExoC15) après maturation en utilisant la technologie Seahorse®, comme décrit dans la **Figure 30 A**. Nous avons observé des différences de niveaux de respiration basale et maximale entre les mDC, les tDC et les DCExoC15 (**Figure 30 B**). L'analyse quantitative montre qu'il existe une différence significative dans l'OCR basale et maximale entre les mDC et les DCExoC15 (**Figure 30 C.1, C.2 et C.3**). Nous avons également analysé la SRC (capacité respiratoire mitochondriale) des différentes moDC et les DCExoC15 ont une SRC inférieure à celle des mDC (**Figure 30 C3**).

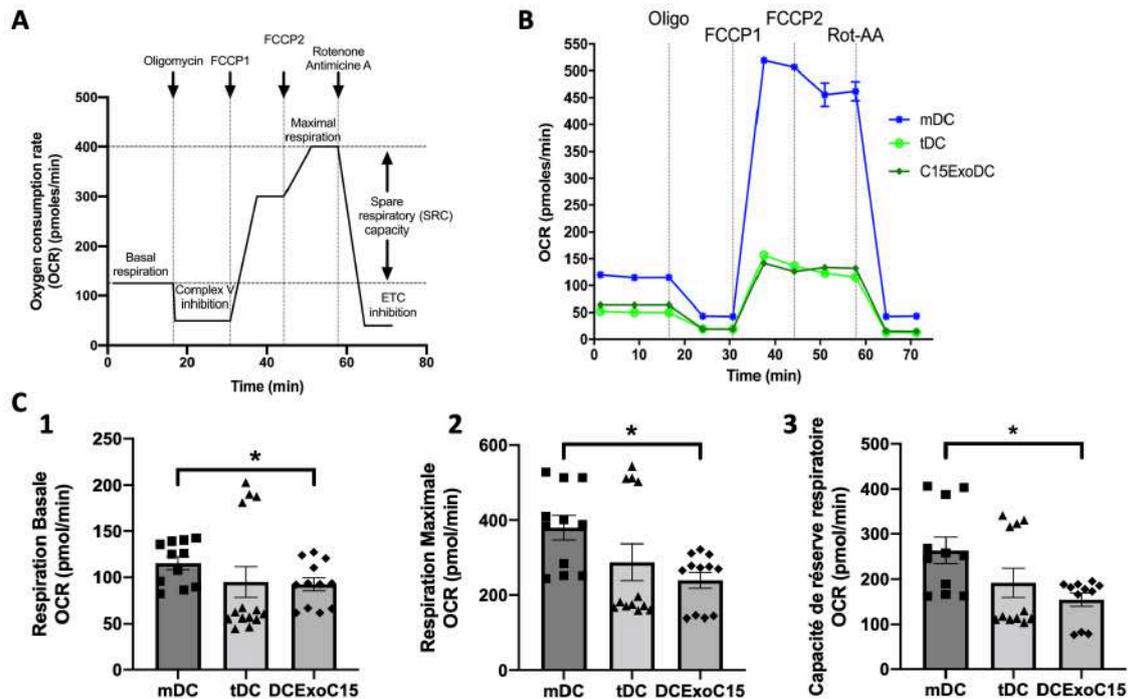


Figure 30 : Caractérisation de la fonction mitochondriale des moDC. (A) Représentation schématique de l'analyse de la respiration mitochondriale en temps réel. L'analyse de l'OCR commence par la mesure de la respiration basale puis une mesure de la respiration après l'ajout d'oligomycine (inhibiteur du complexe V), de FCCP (induction de la respiration maximale), et du mélange roténone/Antimycine A (inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons [ETC]). La capacité respiratoire mitochondriale (SRC) (respiration maximale - respiration basale) est dérivée de la courbe OCR. (B) Mesure cinétique représentative de l'OCR mitochondriales (pmoles/min) des moDCs matures (mDC, bleu), tolérogènes (tDC, vert) et générées avec les ExoC15 (DCExoC15, vert foncé) par l'ajout d'oligomycine (Olig), de FCCP et de roténone/Antimycine A (Rot-AA) au fil du temps. (C) Quantification de la respiration basale (C.1), de la respiration maximale (C.2) et de la SRC (C.3) des mDC, tDC et DCExoC15 respectivement. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes, moyenne \pm SEM n=3. Les différences statistiques ont été analysées par un test One-Way ANOVA après identification des outliers.

b) Métabolisme glycolytique des moDC

Ensuite, nous avons analysé les variations du métabolisme glycolytique en mesurant l'ECAR (taux d'acidification extracellulaire) dans les moDCs (mDC, tDC et DCExoC15) après maturation, en temps réel en utilisant la technologie Seahorse®, comme décrit dans la **Figure 31 A**. La **Figure 31B** représente un résultat représentatif. Globalement, nous observons une activité glycolytique plus importante dans les tDC par rapport aux mDC et DCExoC15. Les DCExoC15 semble avoir une activité glycolytique légèrement plus faible que les mDC. L'analyse quantitative montre que les mDC, tDC et DCExoC15 ont une glycolyse basale

similaire. En revanche, les tDC semblent avoir un taux de glycolyse, une capacité glycolytique et une réserve glycolytique plus importante que les mDC et les DCExoC15 (Figure 31 C.2 à C.4). Enfin, les DCExoC15 semblent avoir un taux de glycolyse, une capacité glycolytique et une réserve glycolytique similaire aux mDC.

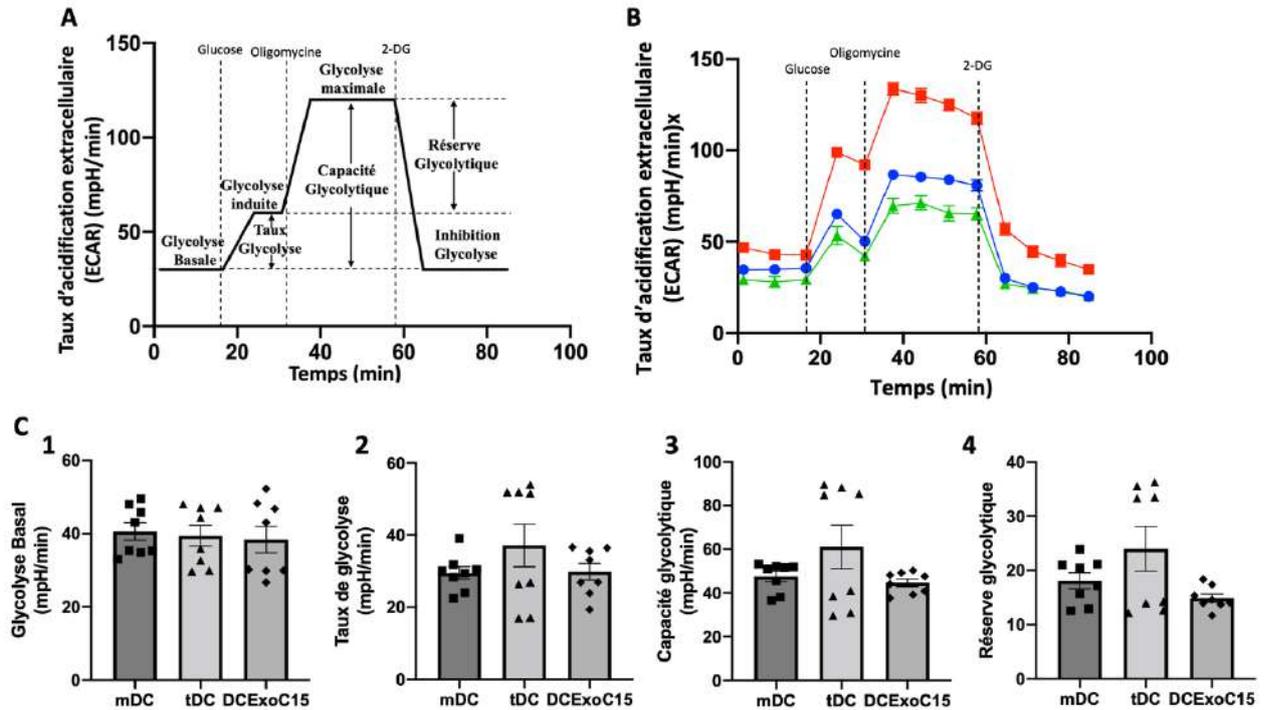


Figure 31 : Analyse de l'activité glycolytique des moDC. (A) Représentation schématique de la mesure de la glycolyse en temps réel. L'analyse de l'ECAR (taux d'acidification extracellulaire) part de l'ECAR Basale, dans lequel les cellules sont incubées dans un milieu sans glucose, suivi de l'ajout de glucose (induction de la glycolyse), d'oligomycine (qui induit une glycolyse cellulaire maximale et une inhibition du complexe V), et enfin l'ajout du 2-déoxy-D-glucose (inhibition de la glycolyse). (B) Mesure cinétique représentative de l'ECAR (pmoles/min) des moDCs matures (mDC, bleu), tolérogènes (tDC, rouge) et générées avec les ExoC15 (DCExoC15, vert). La glycolyse basale, le taux de glycolyse (induction de la glycolyse - glycolyse basal), la capacité glycolytique (glycolyse maximale - glycolyse basal) et la réserve glycolytique (glycolyse maximale - glycolyse induite) sont dérivés de la courbe ECAR (B). (C) Les histogrammes montrent respectivement la glycolyse basale (C.1), le taux de glycolyse (C.2), la capacité glycolytique (C.3) ainsi que la réserve glycolytique (C.4) des différentes moDC. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes, moyenne \pm SEM.

Ces résultats suggèrent que les ExoC15 induisent une modification du métabolisme oxydatif des DC générées, en diminuant les capacités oxydatives et ainsi la mobilisation de cette voie pour la production d'ATP. Concernant le métabolisme glycolytique, les DCExoC15 ne semblent pas avoir de modification en comparaison aux mDC contrôle.

Dans cette première partie de l'étude l'objectif était d'étudier les effets des exosomes C15 de CNP sur le développement des moDC et évaluer dans quelle mesure ces ExoC15 sont susceptibles de modifier le phénotype et la fonction des moDC et favoriser l'émergence de tDC. Les résultats que nous avons obtenus montrent que les DC générées en présence d'ExoC15 sont des DC matures régulatrices (mregDC). En effet, elles ont un phénotype mature mais une fonction régulatrice caractérisée par un défaut de production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et IL-6) et une production de la cytokine IL-4 comme très récemment décrit par Maier et collaborateurs (Maier *et al.*, 2020). Par ailleurs, sur le plan métabolique, ces mregDC ont une baisse de leur capacité à utiliser l'OXPPOS pour fabriquer de l'énergie.

Partie II : Effet des exosomes C15 de CNP sur l'attraction des moDC

A. Rationnel de la chimioattraction des moDC par les ExoC15

D'anciens travaux du laboratoire ont montré que les ExoCNP recrutent les LT (à la fois les LT effecteurs et les Treg) au niveau du site tumoral de façon dépendante de la chimiokine CCL20 portée par les ExoCNP, favorisant l'évasion immunitaire de la tumeur (Mrizak *et al.*, 2015). Sachant cela, nous nous sommes demandés si les DC pouvaient être attirées par les ExoCNP et si oui, si ce mécanisme était dépendant de la chimiokine CCL20. Ainsi une précédente expérience menée au laboratoire a tenté d'étudier l'attraction des moDC par les ExoCNP (**Figure 32 A**). Ce premier test de chimioattraction en chambre de Boyden visait à mettre en évidence une possible attraction des moDC (mDC, tDC et DCExoC15) par les ExoC15 et la dépendance de cette attraction par la CCL20 en utilisant un anticorps bloquant la CCL20 (**Figure 32 A**). Lors de ce test il a été observé que les ExoC15 semblaient attirer les tDC et les DCExoC15 mais pas les mDC. De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant la CCL20 semblait inhiber l'attraction par les ExoC15. Ce résultat a été obtenu suite à une expérience et a donc nécessité d'être réitéré pour confirmer ou non les observations.

Parallèlement nous avons regardé par RT-qPCR l'expression du récepteur à la CCL20 (CCR6) ainsi que du récepteur à la CCL19 (CCR7) impliqué dans la migration vers les organes lymphoïdes secondaires (**Figure 32 B**). Les résultats de RT-qPCR montrent que les mDC expriment fortement le CCR7 contrairement aux tDC. Inversement, les tDC expriment de façon importante le CCR6 ce qui n'est pas le cas des mDC. Enfin, les DCExoC15 expriment à la fois CCR7 et CCR6 et sont donc susceptibles d'être attirées par les chimiokines correspondantes (**Figure 32 B**).

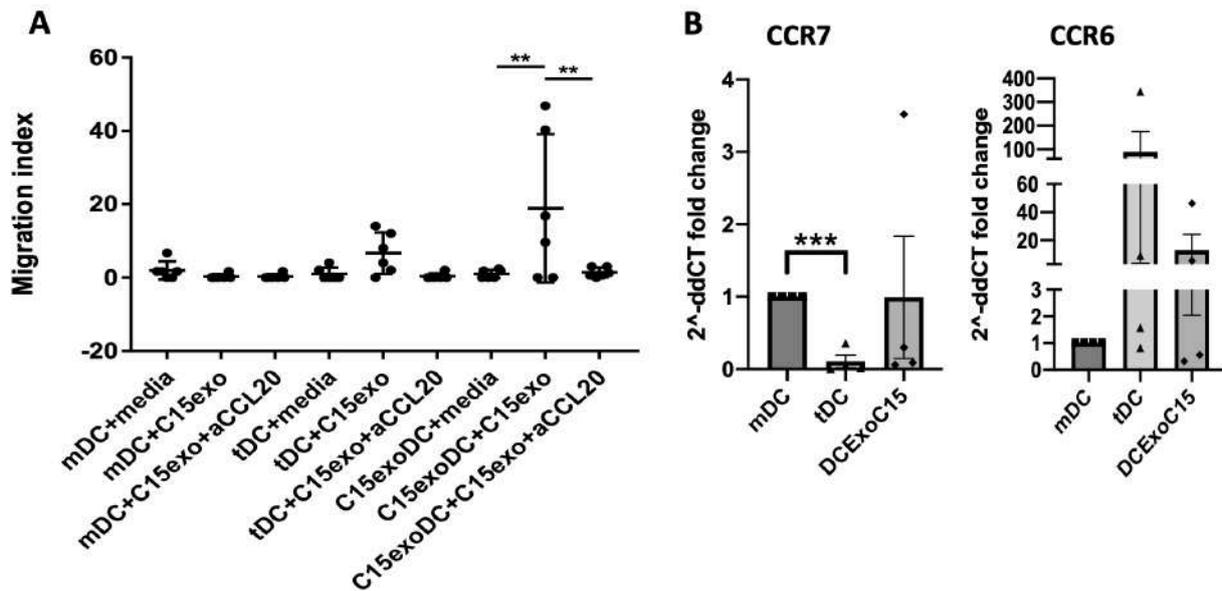


Figure 32 : Effet chimioattracteur des ExoC15 et étude de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCL19 et CCL20 (CCR7 et CCR6). (A) Test de chimioattraction en chambre de Boyden des moDC par les ExoC15 en présence ou non d'anticorps bloquant la CCL20 (aCCL20). La chimioattraction est exprimée en index de migration en utilisant la condition avec milieu de culture comme référence pour chaque moDC, n=1, *p<0.05, **p<0.01. (B) Niveau d'expression de CCR7 et CCR6 par RT-qPCR dans les mDC, tDC et DCExoC15. Les données sont représentatives de quatre expériences indépendantes normalisées par rapport à l'expression des gènes dans la condition mDC contrôles, moyenne ± SEM.

B. Étude de la chimioattraction des moDC par vidéo-microscopie

i. Méthodes d'études de la migration des DC par vidéo-microscopie en temps réel

Dans le but de poursuivre l'étude de la chimioattraction des DC par les ExoCNP, nous avons mis au point une expérience de chimioattraction par vidéo-microscopie de fluorescence en temps réel expliquée dans la **Figure 33**. Pour cela, les différentes moDC (mDC, tDC et DCExoC15) ont été marquées avec des molécules fluorescentes et mise dans un gel de collagène puis ensemencées dans des μ Slide Chemotaxis (**Figure 33**). Les μ Slide ont ensuite été disposées dans la chambre d'incubation d'un vidéo-microscope et nous avons suivi le déplacement des moDC en prenant des photos toutes les 5 minutes pendant 6h. A la fin de l'expérience un suivi de la trajectoire de déplacement des moDC a été réalisé permettant d'obtenir des graphiques de migrations comme exposé dans le (**Figure 33**). Enfin à partir de ces données de migrations, nous avons analysés différents paramètres permettant d'apprécier la chimioattraction des moDC par les ExoC15 ou les chimiokines CCL19 et CCL20.

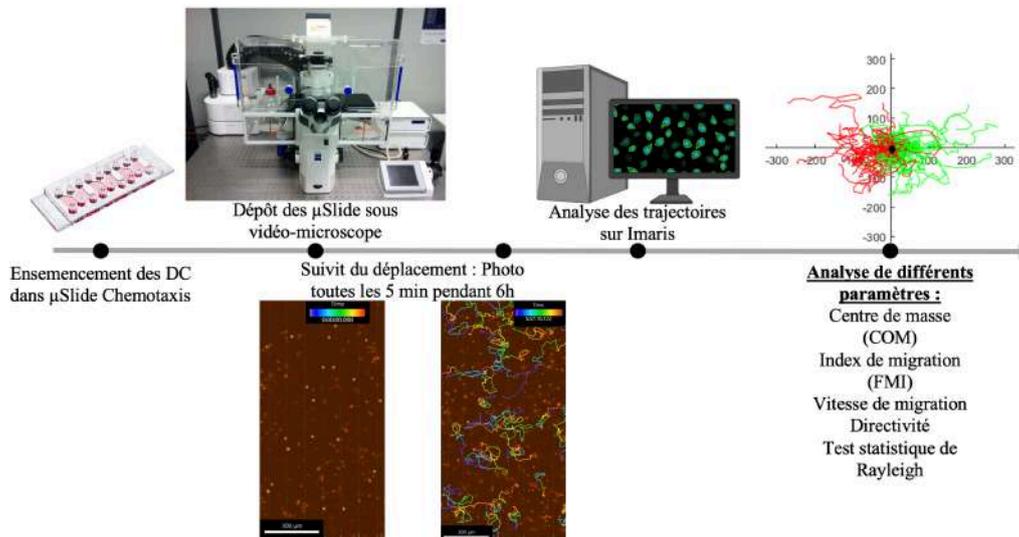


Figure 33 : Schéma représentatif du protocole expérimental d'étude de la chimioattraction des moDC. Les moDC sont déposées dans une μ Slide Chemotaxis puis mises sous vidéo microscope. Nous prenons des images toutes les 5 minutes pendant 5 à 6h puis nous réalisons sur Imaris un suivi de la migration cellule par cellule permettant d'obtenir des coordonnées de migration et de réaliser les graphiques de migration. Enfin nous analysons différents paramètres quantitatifs de la migration.

ii. Chimioattraction des moDC par les ExoC15 de CNP

Pour évaluer l'importance des exosomes de CNP sur le développement de la tumeur, nous avons évalué leur capacité à attirer les moDC. Les DC ont été ensemencées dans des chambres μ -Slide Chemotaxis et exposées au milieu de culture, au gradient de CCL19 (comme contrôle) ($100\mu\text{g/mL}$), de CCL20 ($100\mu\text{g/mL}$) ou au gradient de ExoC15 ($5\mu\text{g/mL}$) décroissant de droite à gauche (**Figure 34**). **L'annexe 1** montre des représentations des moDC pendant leur migration. Les graphiques de migration permettent de voir que les mDC et les C15ExoDC ont une capacité de migration dans toutes les conditions alors que les tDC ne semblent pas se déplacer et semblent paralysées (**Figure 34**). Lorsque les moDC ont été soumis à un gradient de CCL19 (croissant suivant l'indicateur au-dessus du graphique), les mDC et les DCExoC15 migrent vers cette chimiokine alors que les tDC ne migrent pas (**Figure 34 D, E, F**). Concernant le gradient d'ExoC15 (**Figure 34 G, H, I**), nous observons que certaines mDC se déplacent vers le gradient d'ExoC15 et que les autres semblent migrer dans la direction opposée, tandis que les tDC ne migrent pas. Il est intéressant de noter que les DCExoC15 migrent de manière plus importante vers le gradient d'ExoC15 que les mDC (**Figure 34 I**). Enfin, nous avons étudié l'attraction des moDC pour la CCL20 (**Figure 34 J, K, L**) et nous observons que les mDC semblent migrer vers CCL20 tandis que les DCExoC15 ne semblent pas spécifiquement migrer vers cette chimiokine. Concernant les tDC comme observé dans les autres conditions de migration, elles ne sont pas mobiles.

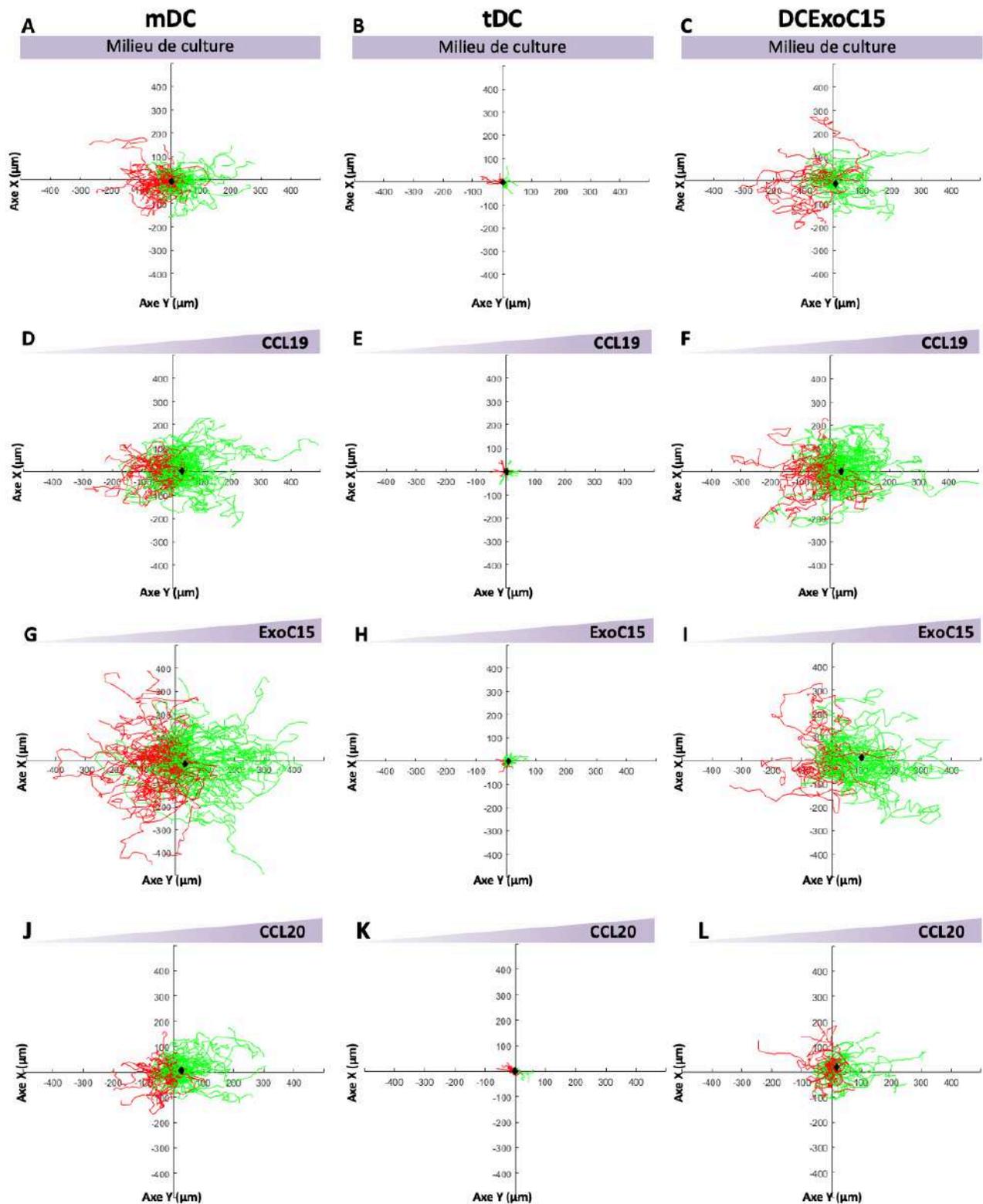


Figure 34 : Migration in vitro des mDC, des tDC et des DCExoC15 par vidéo-microscopie. Migration des mDC (A, D, G et J), tDC (B, E, h et K) et DCExoC15 (C, F, I et L) en présence de milieu de culture (MC), de CCL19, d'ExoC15 et de CCL20 respectivement. Les flèches au-dessus des graphiques indiquent le gradient croissant de chaque agent. Les symboles noirs indiquent le centre de masse (COM) à la fin de l'expérience correspondant à la migration moyenne des cellules. Entre 40 et 50 cellules ont été analysées pour chaque type cellulaire et pour chaque condition. En rouge sont représentées les cellules qui ne vont pas vers le gradient, tandis qu'en vert figurent les cellules allant vers le gradient.

Une analyse quantitative de la migration a ensuite été réalisée en mesurant les paramètres liés à la vitesse, à la « directionnalité » (Index de migration (FMI) parallèle et perpendiculaire au gradient, directivité, p-value du test de Rayleigh des mDCs, tDCs et C15ExoDCs ainsi que le déplacement moyen des DC appelé centre de masse (COM) parallèle au gradient CCL19, ExoC15 et CCL20 (**Figure 35**). La vitesse de migration (vélocité) des DCs en présence de CCL19 et de CCL20 ne change pas par rapport à celle dans la condition contrôle avec du milieu de culture (MC) (**Figure 35 A**). En revanche, en présence d'un gradient d'ExoC15, la vitesse de migration des mDC et DCExoC15 augmente significativement (**Figure 35 A**). En regardant le COM parallèle au gradient des mDC en présence de CCL19 et de CCL20 on observe que celui-ci est fortement supérieur par rapport à la condition contrôle avec MC indiquant une attraction pour les 2 chimiokines (**Figure 35 B**). De plus, l'augmentation du FMI parallèle au gradient et le FMI perpendiculaire proche de zéro soutienne l'attraction des mDC (**Figure 35 C et D**). La directivité (**Figure 35 E**) des mDC en présence de CCL19 et de CCL20 montre une trajectoire qui n'est pas directe vers les chimiokines traduisant une force d'attraction moyenne. Cette attraction par la CCL19 et la CCL20 est confirmée par le test statistique de Rayleigh (**Figure 35 F**) montrant une p-value <0,05 signifiant une migration préférentielle des mDC vers les 2 chimiokines. Néanmoins nous remarquons qu'en présence de CCL19 ce test est beaucoup plus significatif qu'avec la CCL20 montrant une attraction plus importante pour la CCL19. De plus, les ExoC15 semblent attirer les mDC de la même manière que le CCL19, visible par l'augmentation de la COM parallèle au gradient (**Figure 35 A**). En revanche, le FMI parallèle au gradient n'est pas significativement plus important en présence d'ExoC15 et le test de Rayleigh ne montre pas d'attraction préférentielle ($p > 0,05$) des mDC en présence des ExoC15.

Concernant les tDC, les COM parallèles aux différents gradients sont proches de 0 indiquant que les cellules ne migrent pas comme nous l'avons observé sur les graphiques de migration (**Figure 34**). Ainsi, avec cette absence de migration des tDC, les autres paramètres mesurés ne sont pas interprétables.

Concernant les DCExoC15, nous observons comme pour les mDC une attraction par la CCL19 indiqué par les COM parallèles, les FMI perpendiculaire proche de 0 (**Figure 35 B et D**). De façon intéressante, nous observons que les ExoC15 ont attiré plus fortement que la CCL19 les DCExoC15 visible par le COM parallèle au gradient important (100 μm VS 40 μm) ainsi que par l'augmentation significative du FMI parallèle (**Figure 35 B et C**). Cette attraction pour la CCL19 et les ExoC15 n'est pas directe comme le montre la directivité proche de 0 (**Figure 35 E**). De plus le test de Rayleigh montre une attraction significative des DCExoC15

pour les ExoC15 et la CCL19, mais qui est plus significative pour l'attraction par les ExoC15 (**Figure 35 F**). Enfin, lors du test d'attraction des DCExoC15 par la CCL20, nous n'observons qu'une très faible augmentation du COM parallèle au gradient (**Figure 35 B**) par rapport aux MC et le test Rayleigh ne montre pas d'attraction significative ($p > 0,05$) (**Figure 35 F**).

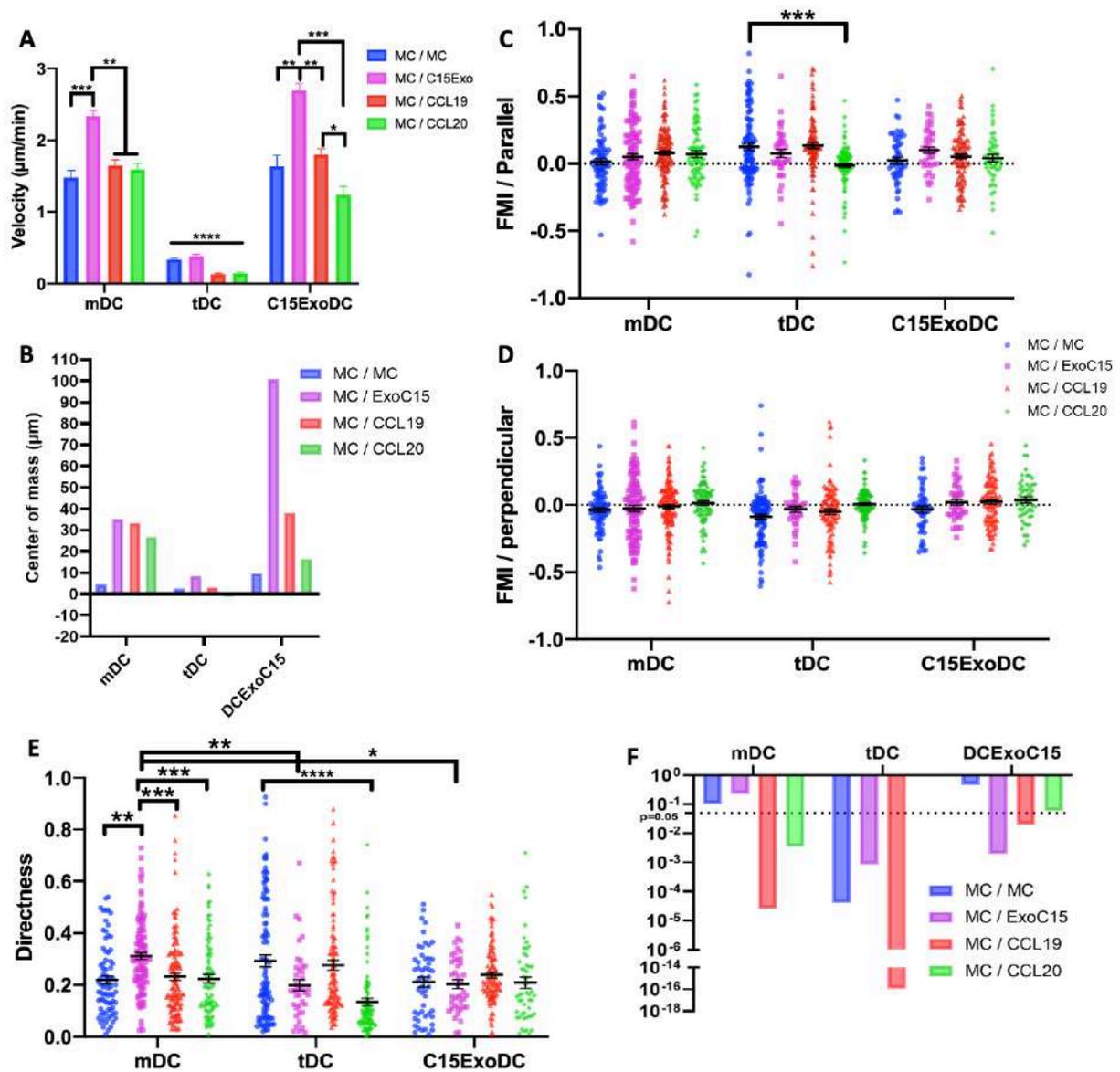


Figure 35 : Analyse quantitative du comportement migratoire illustré dans la Figure 34. Analyse des paramètres de migration incluant la vitesse (**A**), le COM parallèle au gradient (**B**), les FMI (Forward migration index) parallèle (**C**) et perpendiculaire (**D**), la directivité (**E**) et les p-value des tests de Rayleigh (**F**). Les graphiques (**A**, **C**, **D** et **E**) sont exprimés en moyenne \pm SEM. Expériences représentatives de 3 expériences pour les mDC et 2 expériences pour les tDC et les DCExoC15 en présence de CCL19. La migration en présence d'ExoC15 a été réalisée 2 fois pour les mDC et 1 fois pour les tDC et les DCExoC15. Enfin, la migration en présence d'un gradient de CCL20 a été observée dans 2 expériences indépendantes pour les mDC et les tDC et dans une expérience pour les DCExoC15. Les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA avec * $p < 0,05$ est considéré comme significatif ; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Dans cette deuxième partie de l'étude l'objectif était d'étudier les effets des exosomes C15 de CNP sur l'attraction des moDC. L'ensemble de ces résultats montre que les DCExoC15 semblent être attirées par les ExoC15 de CNP de façon plus importante que par la CCL19, chimiokine impliquée dans la migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Néanmoins, les DCExoC15 ne semblent pas être spécifiquement attirées par la CCL20 laissant penser que la chimioattraction par les ExoC15 n'est pas dépendante de la CCL20. Des expériences supplémentaires sont à réaliser et pourront permettre de confirmer l'implication ou non de la CCL20 dans ce mécanisme ouvrant sur d'autres chimiokines.

Partie III : Effet des exosomes de patients de CNP sur les moDC

En collaboration avec le Dr. Hayet Rafa à l'hôpital Mustapha-Bacha (Alger, Algérie), nous avons pu collecter des échantillons de plasma de patients atteints de CNP. A partir de ces échantillons, les vésicules extracellulaires plasmatiques ont été classiquement isolés par ultracentrifugation et purification sur coussin de sucrose (cf Matériels et Méthodes). Les échantillons de chaque patient représentant environ 5 mL de plasmas, le contenu en vésicules extracellulaires était trop faible pour les isoler individuellement. Ainsi, les échantillons de patients ont été regroupés en fonction de leur traitement, du stade (classification TNM) et du statut de EBV. Le **Tableau 9** résume les différents groupes et les stades de développement des patient CNP. Ainsi nous avons réitéré un certain nombre d'expériences identique à la Partie I avec des vésicules extracellulaires de patients CNP.

Tableau 7 : Regroupement des patients CNP en fonction de leur stade (classification TNM), des traitements et du statut EBV. Les volumes de plasma (mL) ainsi que les quantités d'exosomes isolés (µg) sont également montrés.

	Stade	Classification TNM	Traitements	Statut EBV	Volume plasma (mL)	Quantity of exosomes (µg)
Pool K	Stade II		No treatment	EBV (-)	11	9,64
Pool A	Stade II	T2aN0M0	TPx	EBV (+)	15	5,25
Pool F	Stade II		TPX+Cetazima	EBV (+)	25	10,95
Pool J	Stade II		TPx	EBV (+)	25	21,47
Pool B	Stade III	pT3bN0M0	TPx	EBV (+)	8	4,28
Pool D	Stade III	pT3N0M0 ; pT3N1M0	TPx	EBV (+)	10	5,72
Pool G	Stade III	pT3NxM0	TPx	EBV (+)	9	4,53
Pool H	Stade III	pT3N0M0 III	No treatment	EBV (+)	24	25,92
Pool I	Stade IV		TPx	EBV (+)	16,5	6,43
Pool C	Stade IV	pT4N2aM1 ; T4N0M0	TPx	EBV (+)	15	8,98
Pool E	Stade IV C	pT4bN4M0 ; pT3N1M1 ; pT2N2aM1a	TPx	EBV (+)	10	4,75

A. Caractérisation des EVs de patients CNP et de Donneurs Sains

i. Caractérisation morphologique et phénotypique des EVs

Comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes, les EVs de donneurs sains (EVDS) et de patients CNP (EVPatient) ont été isolées précédemment au laboratoire par ultracentrifugation et purification sur coussin de sucrose. Ensuite, elles ont été caractérisées morphologiquement par TRPS et/ou microscopie électronique et phénotypiquement par Western Blot (**Figure 36**). Les EVDS ont tout d'abord été analysés par microscopie électronique après un contraste au PTA (**Figure 36 A**) montrant un diamètre moyen de 60,9 nm

($\pm 19,5$ nm). Parallèlement nous avons analysé la répartition de taille des EVDS par TRPS et nous observons un diamètre moyen de 115 nm (± 45 nm) et un diamètre médian de 105 nm (**Figure 36 B**).

Ensuite par WB nous avons regardé la présence des marqueurs caractéristiques des exosomes et nous observons bien la présence des tétraspanines caractéristiques des exosomes CD63 et CD81. En revanche, HLA-DR n'est pas présent (**Figure 36 C**).

Concernant les EVPatient, nous avons analysé la répartition de tailles des vésicules extracellulaires par TRPS (**Figure 36 D**). Cette analyse nous permet d'observer que les vésicules extracellulaires analysées ont bien une taille majoritairement comprises entre 50 et 200 nm avec un diamètre moyen de 134 nm ($\pm 74,2$ nm) et un diamètre médian de 87 nm (**Figure 36 D**). Les EVPatient ont donc bien une taille caractéristique des SEVs. En revanche, en raison des très faible quantité d'EVPatient que nous avons isolé, nous n'avons pas réalisé d'analyse par Western Blot afin de nous permettre d'étudier les capacités régulatrices de ces EVs sur les DC. Ainsi les EVs de patient CNP seront appelés SEVPatient pour le reste de l'étude.

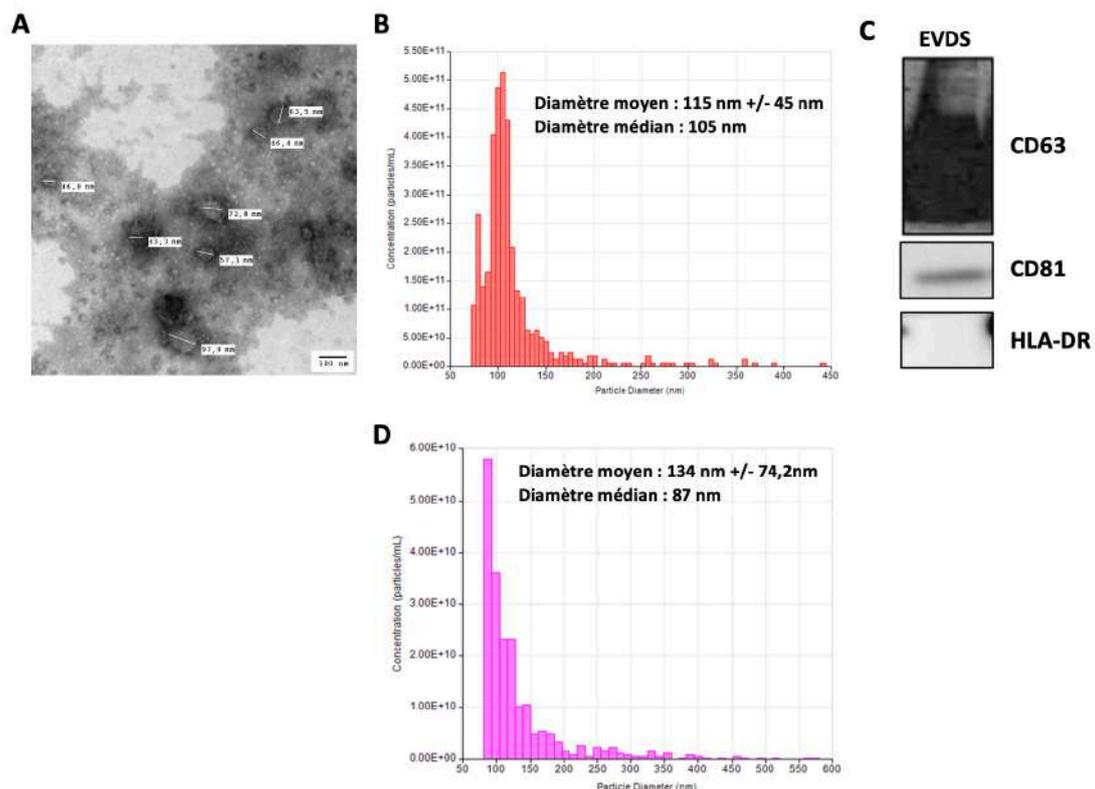


Figure 36 : Caractérisation des EVs de donneurs sains et de patients atteint de CNP. Analyse morphologique des vésicules extracellulaire (EVs) de donneurs sains (EVDS) par microscopie électronique après contraste avec 2% d'acide phosphotungtique (PTA) (**A**), par analyse de leur taille et concentration par TRPS (**B**). **C**. Western Blot représentatif des protéines CD63, CD81 et HLA-DR présent ou non sur les EVDS. (**D**) Analyse par TRPS de la répartition de taille et concentration des EV isolés à partir du plasma d'un patient atteint de CNP.

Ainsi ces résultats montrent que les EVDS et les EVPatient ont bien une taille correspondante aux SEVs. De plus, les EVDS portent le marqueur caractéristique des exosomes CD63. Dans la suite de ce manuscrit, nous les dénommerons exosomes de donneurs sains (ExoDS) et SEV de patients (SEVPatient)

ii. Caractérisation fonctionnelle des SEVPatient et des ExoDS

Comme mentionné dans la partie I.C, les exosomes de CNP ont été décrit par Klibi *et al.* comme étant immunosuppresseur et ainsi supprimer la prolifération des cellules immunitaires (Klibi *et al.*, 2009). Nous avons validé cela avec la lignée C15 de CNP dans la première partie de cette thèse et nous avons également analysé cette propriété dans les SEVPatient. Pour cela, nous avons choisi 3 échantillons de patient : les SEVPatient J, les SEVPatient C et les SEVPatient D respectivement en stade II, III et IV de CNP. Comme précédemment, nous avons réalisé un test de prolifération de PBMC humains en présence ou non de ces SEVPatient ou d'ExoDS comme contrôle (**Figure 37**). Les PBMC humains ont été activés et mis en co-culture avec les ExoDS à 0,5 µg/mL et 5 µg/mL ou avec les SEVPatient 0,5 µg/mL et 5 µg/mL (quand les quantités isolées nous le permettaient) et nous avons mesuré la prolifération après 72h de culture comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes. La **Figure 37** montre que les ExoDS n'impactent pas la prolifération des PBMC A. Les SEVPatient J à 0,5 et 5 µg/mL diminuent la prolifération des PBMC de 24,7% et 45% respectivement. De même, les SEVPatient D diminuent la prolifération des PBMC de 24,2% à 0,5 µg/mL. Nous n'avons malheureusement pas pu tester l'effet des SEVPatient D à 5 µg/mL faute de quantité suffisante pour les autres expériences. Concernant les SEVPatient C, nous observons une faible diminution de la prolifération (14% et 8,2% à 0,5 et 5 µg/mL respectivement).

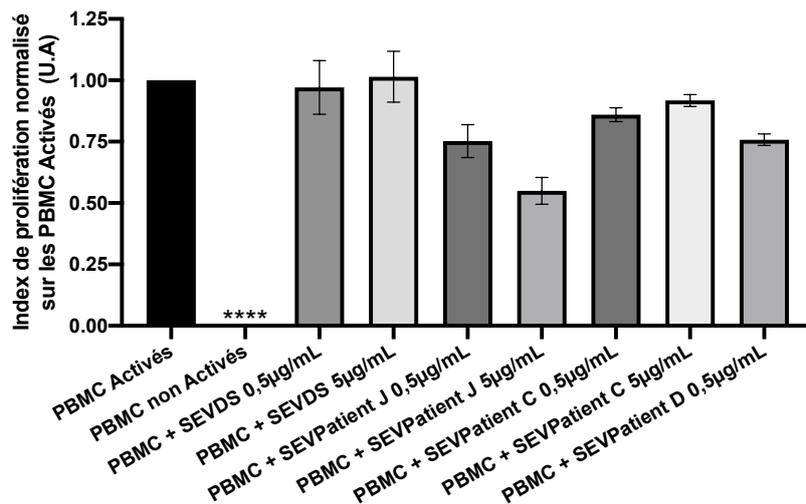


Figure 37 : Test de prolifération des PBMC en présence ou non des ExoDS ou SEVPatient.

Les propriétés immunosuppressives des SEVPatient ont été testées par le biais d'un test de prolifération. Les PBMC non activés ont été utilisés comme contrôle négatif de prolifération et les PBMC activés comme contrôle positif. Les ExoDS ont servi de contrôle d'exosomes plasmatique de donneurs sains. Les résultats sont exprimés en index de prolifération normalisés sur la condition contrôle PBMC activés, moyenne \pm SEM, $n=4$ pour les conditions avec ExoDS, $n=1$ pour les conditions avec les SEVPatient. Les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA avec $*p<0,05$ est considéré comme significatif ; $****p<0,0001$.

Ainsi ces résultats semblent bien confirmer la capacité immunosuppressive des SEVPatient sur les PBMC humains.

B. Caractéristiques fonctionnelle et phénotypique des DC générées en présence des ExoDS et SEVPatient

i. Propriétés régulatrices des DC générées avec les ExoDS et SEVPatient

De façon identique à la **Partie I**, les DC ont été générées à partir des monocytes en présence ou non des ExoDS et des SEVPatient puis différenciées et maturées comme l'explique la **Figure 22**. Afin d'évaluer le potentiel activateur des moDC générées avec les ExoDS (DCExoDS) et les SEVPatient (DCSEVPatient), nous avons testé leur fonction activatrice par le biais d'un test de prolifération en co-culture avec des LT CD3 totaux hétérologues. Pour cela nous avons récupéré les différentes moDC (iDC, mDC, tDC, DCExoDS et DCSEVPatient J, C et D) à l'issue des 7 jours de cultures et nous les avons mis en co-culture avec des LT CD3⁺ pour mesurer la prolifération des LT CD3⁺ après 48h, 72h et 96h (**Figure 38**). Le test de prolifération montre qu'après 48, 72 et 96h de co-culture, les mDC augmentent la prolifération des LT CD3⁺ en comparaison avec les iDC et les tDC contrôles (**Figure 38 A, B et C**). Les

DCExoDS ne semblent impacter que faiblement la prolifération des LT CD3⁺ hormis à 72h où une baisse de prolifération est observable. De façon intéressante, les différentes DCSEVPatient (J, C et D) diminuent la prolifération des LT CD3⁺ dès 48h de co-culture avec respectivement 87%, 81% et 44,7% de prolifération en moins que les mDC contrôles (**Figure 38 A**). Cette baisse de prolifération des LT CD3⁺ est maintenue après 72h avec une baisse de prolifération de 83,8%, 70% et 60% pour les DCSEVPatient J, C et D (**Figure 38 B**). Enfin, à 96h cette diminution de prolifération perd en intensité mais reste tout de même observable avec respectivement 68%, 41% et 36,4% de prolifération en moins que les mDC contrôles (**Figure 38 C**).

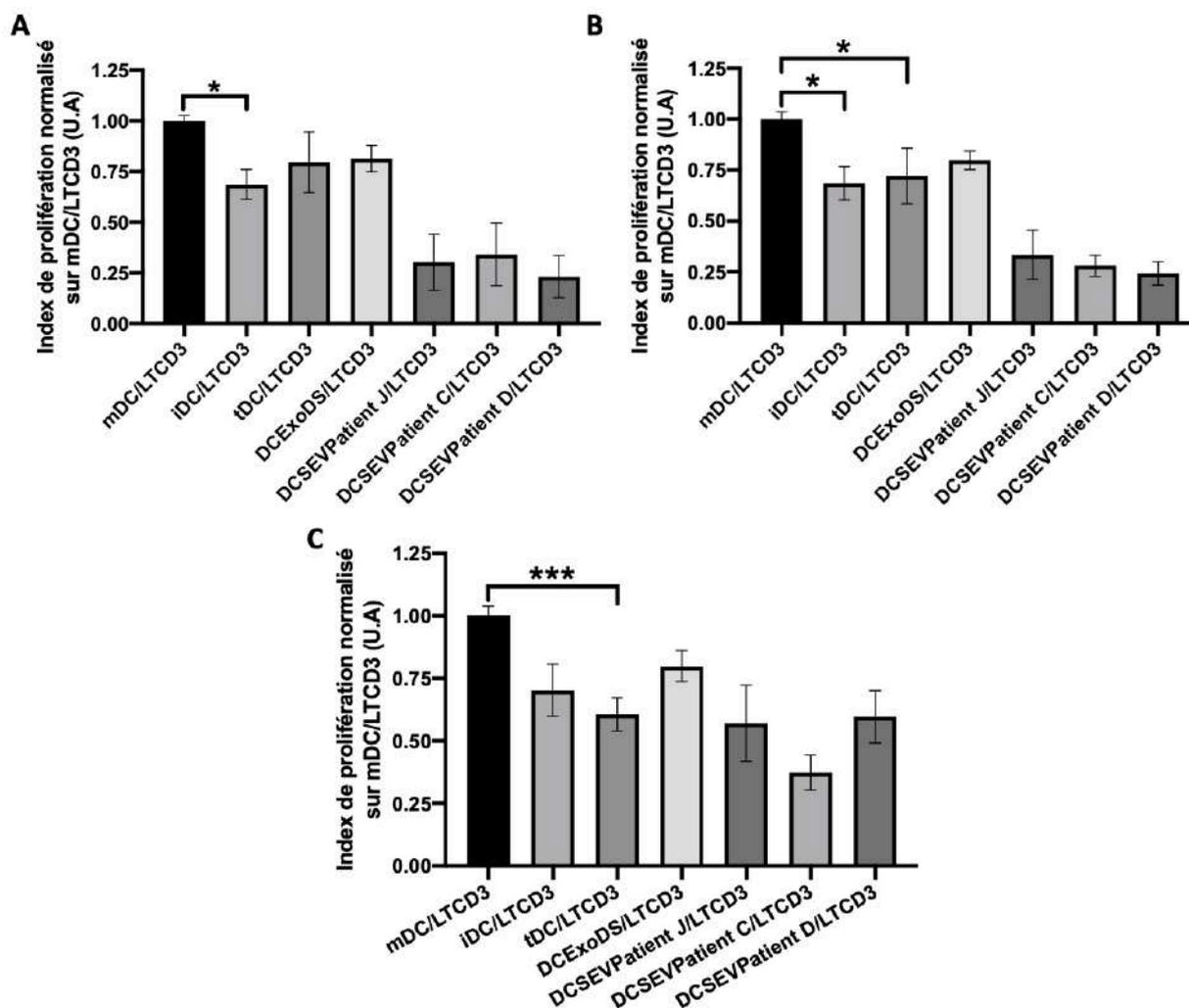


Figure 38 : Test de prolifération des LT CD3⁺ en présence de moDC. Test de prolifération des LT CD3⁺ en co-culture avec les iDC, mDC, tDC DCExoDS, DCSEVPatient (J, C et D) après 48h (A), 72h (B) et 96h (C). Les résultats sont exprimés en index de prolifération normalisés sur la condition mDC/LTCD3, moyenne \pm SEM, n=4 pour les mDC, iDC, tDC et DCexoDS et n=1 pour les DCSEVPatient J, C et D. Les différences statistiques entre la condition mDC/LTCD3 et les autres conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA avec *p<0,05 est considéré comme significatif ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ;

Ces résultats confirment que les DCSEVPatient ont une fonction immunorégulatrice en diminuant l'activation des LT. Les SEVPatient semblent donc également capable d'impacter la fonction d'activation des DC en leur conférant une fonction tolérogène. De façon très intéressante, ces résultats réalisés avec 3 échantillons de patients confortent bien les données obtenues avec les Exosomes de C15.

ii. Étude du phénotype des DC générées avec les ExoDS et SEVPatient

Après avoir observé les effets régulateurs des DCSEVPatient, nous nous sommes intéressés au phénotype de ces moDC à l'issue de la différenciation et de la maturation.

Pour cela, nous avons regardé par cytométrie en flux l'expression des molécules membranaires CD11c, CD14, des marqueurs de co-stimulation (CD40, CD80, CD83, CD86) de présentation antigénique (HLA-DR) et du marqueur des iDC DC-SIGN. Les valeurs de RMFI (Ratio de médiane de fluorescence) de chaque marqueur, dans chacune des moDC générées, sont montrées dans le **Tableau 8** à l'issue de la différenciation et dans le **Tableau 9** suite à la maturation. Après la différenciation, les ExoDS n'impacte pas l'expression des différents marqueurs par rapport aux iDC contrôles. Concernant les SEVPatient, les DC générées semblent exprimer les différents marqueurs de la même façon hormis pour HLA-DR dont l'expression est plus faible que dans les iDC (**Tableau 8**). Après la maturation, les DCExoDS expriment les différents marqueurs membranaires comme les mDC contrôle. Concernant les DCSEVPatient J et C, nous observons une expression similaire des molécules de maturation par rapport aux mDC hormis pour HLA-DR et DC-SIGN qui semblent être moins présent (**Tableau 9, Figure 39**). Enfin, les pour le DCSEVPatient D, les marqueurs CD40, CD83, CD86, HLA-DR et DC-SIGN sont moins exprimés (**Tableau 9, Figure 39**).

Tableau 8 : Expression des molécules membranaires de population, de costimulation ou de présentation antigénique dans les monocytes et les moDC après la différenciation. Les RMFI ont été obtenues en normalisant les médianes de fluorescences sur la médiane de la condition contrôle iDC. Moyenne des RMFI \pm Écart-type, n=4 pour les monocytes (Mono), iDC, tDC et DCExoDS ; n=1 pour les DCSEVPatient J, C et D.

	CD11c	CD14	CD40	CD80	CD83	CD86	HLA-DR	DC-SIGN
Mono	0,45 \pm 0,23	3,87 \pm 1,61	0,05 \pm 0,03	0,45 \pm 0,18	4,39 \pm 6,77	1,05 \pm 0,49	1,69 \pm 1,35	0,02 \pm 0,01
iDC	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
tDC	1,24 \pm 0,36	1,00 \pm 0,16	0,77 \pm 0,27	0,75 \pm 0,37	2,29 3,16	0,85 \pm 0,32	1,09 \pm 0,56	0,60 \pm 0,28
DCExoDS	1,05 \pm 0,37	0,95 \pm 0,22	0,91 \pm 0,24	1,20 \pm 0,92	1,69 \pm 0,88	0,71 \pm 0,32	0,85 \pm 0,44	1,32 \pm 0,74
DCSEVPatient J	1,07	0,87	1,10	1,13	2,07	1,11	0,34	1,80
DCSEVPatient C	0,65	0,77	0,83	1,01	2,02	1,50	0,39	1,31
DCSEVPatient D	0,76	0,84	0,91	0,99	1,66	1,01	0,29	1,55

Tableau 9 : Expression des molécules membranaires de population, de costimulation ou de présentation antigénique dans les moDC après maturation. Les RMFI ont été obtenues en normalisant les médianes de fluorescence sur la médiane de la condition contrôle iDC. Moyenne des RMFI \pm Écart-type, n=4 pour les iDC, mDC, tDC et DCExoDS ; n=1 pour les DCSEVPatient J, C et D.

	CD11c	CD14	CD40	CD80	CD83	CD86	HLA-DR	DC-SIGN
iDC	2,29 \pm 0,79	1,32 \pm 0,49	0,49 \pm 0,07	0,37 \pm 0,20	0,12 \pm 0,05	0,11 \pm 0,02	0,26 \pm 0,06	0,83 \pm 0,66
mDC	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
tDC	1,50 \pm 0,44	9,19 \pm 7,98	0,40 \pm 0,13	0,59 \pm 0,22	0,25 \pm 0,15	0,15 \pm 0,10	0,33 \pm 0,39	0,53 \pm 0,11
DCExoDS	1,05 \pm 0,12	1,01 \pm 0,10	0,94 \pm 0,09	0,82 \pm 0,33	0,94 \pm 0,33	0,95 \pm 0,55	0,95 \pm 0,30	0,93 \pm 0,15
DCSEVPatient J	0,77	0,91	0,85	0,89	1,01	0,92	0,39	0,42
DCSEVPatient C	0,82	0,87	1,03	1,04	1,03	1,07	0,65	0,55
DCSEVPatient D	1,86	0,88	0,70	0,91	0,79	0,59	0,46	0,53

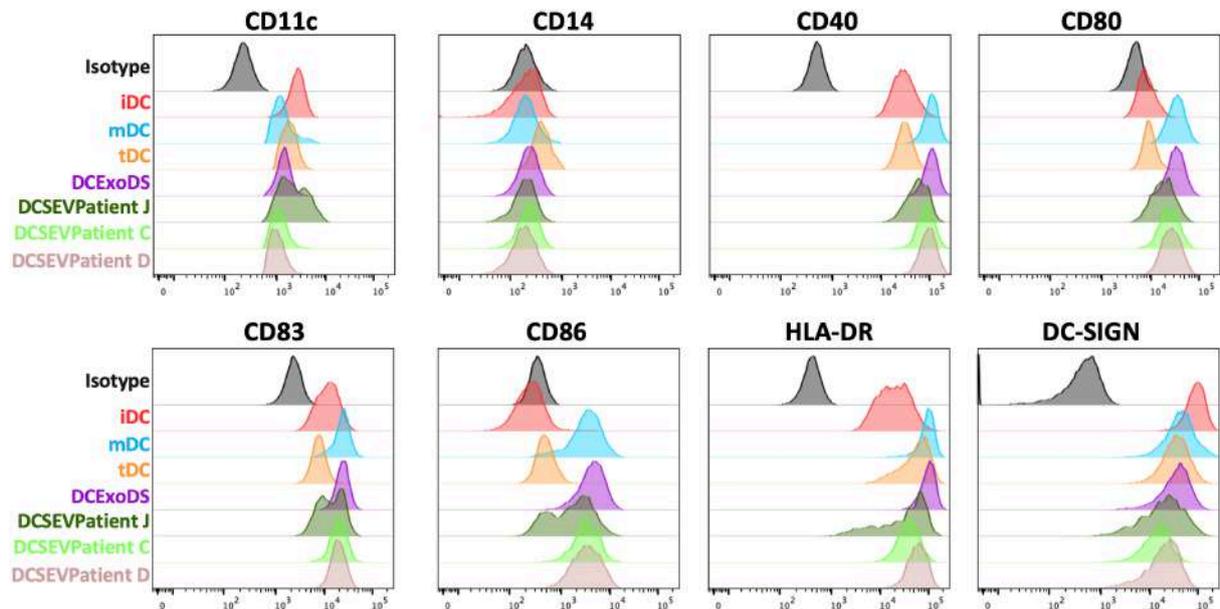


Figure 39 : Caractérisation phénotypique des moDC après maturation. Niveau d'expression des marqueurs membranaires de surface CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, DC-SIGN dans les iDC (rouge), mDC (bleu), tDC (orange), DCExoDS (violet), DCSEVPatient J (vert foncé), DCSEVPatient C (vert clair) et DCSEVPatient D (marron clair) après maturation. L'isotype contrôle apparaît en noir. Les graphiques sont représentatifs de 4 expériences indépendantes pour les mDC, iDC, tDC, DCExoDS et d'une expérience pour les DCSEVPatient J, C et D.

iii. Propriétés immunorégulatrices des DCExoDS et DCSEVPatient *via* le secrétome

Après l'étude phénotypique des moDC, par cytométrie en flux, nous avons étudié la sécrétion des cytokines ainsi que les métabolites Trp et Kyn d'IDO après différenciation (**Figure 40**) et après maturation (**Figure 41**) comme pour l'étude sur les ExoC15 de CNP. Après la phase de différenciation, nous avons dosé par ELISA la production des cytokines effectrices IL-12p70, IL-6 ainsi que les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β . Concernant la cytokine effectrice, nous observons une faible sécrétion d'IL-12p70 par toutes les moDC (**Figure 40 A1**). En revanche L'IL-6 est fortement produite par les DCExoDS et les DCSEVPatient J (**Figure 40 A2**). En ce qui concerne les cytokines immunosuppressives, le TGF- β est faiblement sécrété par les monocytes, iDC, tDC et DCExoDS (environ 20 pg/ml). Les DCSEVPatient C semblent sécréter légèrement plus de TGF- β (**Figure 40 A3**). L'IL-10 est produite significativement plus par les iDC, tDC et DCExoDS par rapport aux monocytes. Les DCSEVPatient C et D produisent autant d'IL-10 que iDC et tDC tandis que les DCSEVPatient J n'en produisent pas (**Figure 40 A4**). Parallèlement, nous avons mesuré par HPLC le rapport Kynurénine/Tryptophane et nous observons que les différentes cellules ont le même ratio Kyn/Trp (**Figure 40 B**).

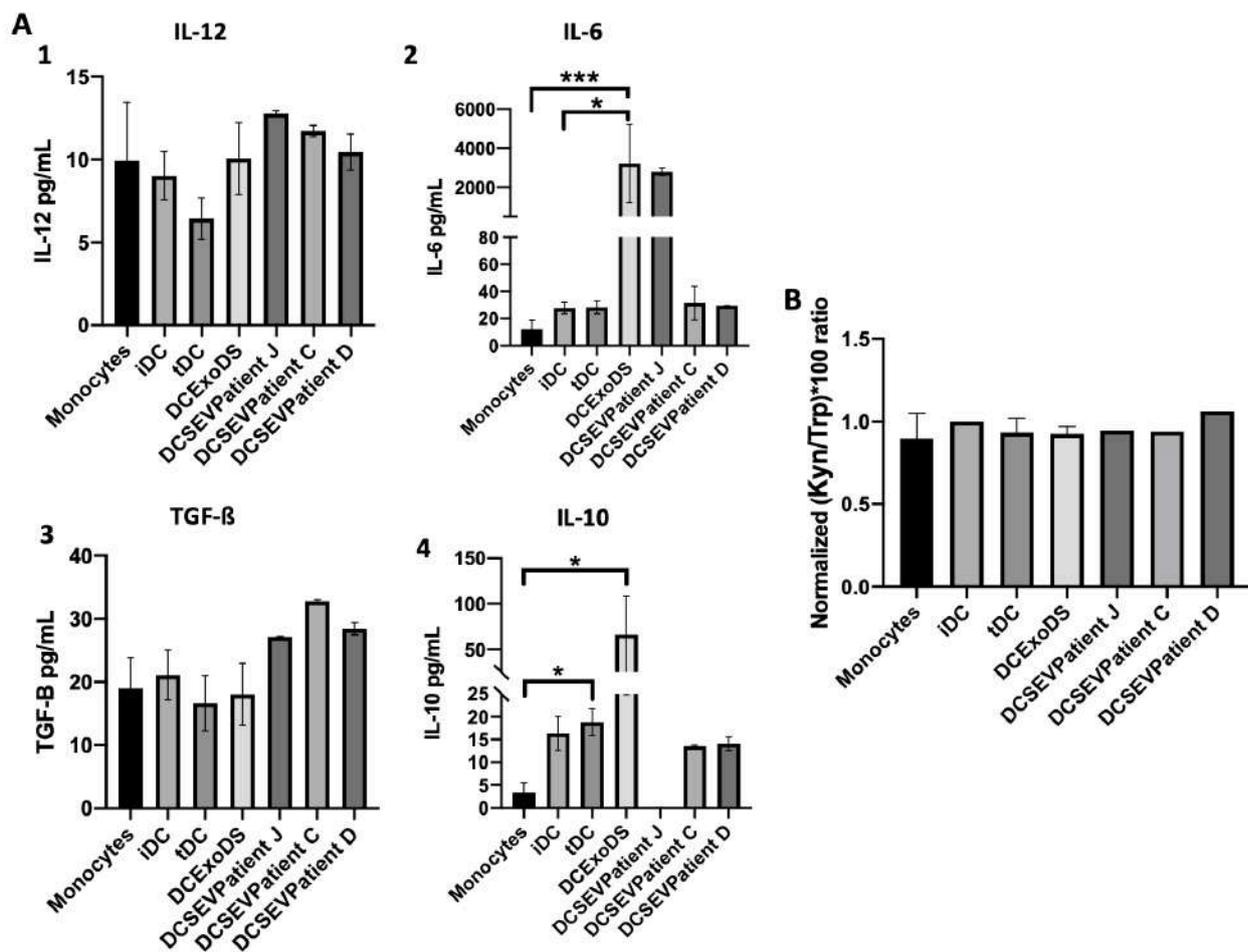


Figure 40 : Dosage des cytokines sécrétées par les moDC et étude des métabolites d'IDO après différenciation. (A) Dosage de la sécrétion de cytokines par ELISA dans le surnageant de culture des monocytes et des MoDCs. (A1-2) Sécrétion des cytokines proinflammatoires IL-12 et IL-6, (A3-4) dosage des cytokines immunosuppressives TGF-β et IL-10. Les résultats sont exprimés en concentration de cytokines (pg/mL), moyenne ± SEM. n=4 pour les monocytes, iDC, tDC et DCExoDS, n=1 pour les DCSEVPatient. (B) Dosage par HPLC du Tryptophane et de la Kynurénine. Les résultats sont exprimés en ratio (Kyn/Trp) x100 normalisé sur iDC, moyenne ± SEM. n=4 pour les monocytes, iDC, tDC et DCExoDS, n=1 pour les DCSEVPatient. Toutes les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA ou par un test de Kruskal-Wallis avec *p<0.05, ***p<0,001.

Nous avons réalisé la même étude après la maturation en dosant les cytokines par ELISA et les métabolites Trp et Kyn par HPLC (Figure 41). Le dosage de l'IL-12 montre que les DCExoDS produisent une quantité similaire d'IL-12 au mDC tout comme les DCSEVPatient C et D, alors que les DCSEVPatient J semblent en produire moins (Figure 41 A1). En revanche l'IL-6 semble être moins produite par les DCExoDS et les trois DCSEVPatient par rapport aux

mDC (**Figure 41 A2**). En ce qui concerne le TGF- β et l'IL-10, toutes les moDC produisent une quantité similaire hormis les tDC qui produisent plus d'IL-10 (**Figure 41 A3 et A4**).

Enfin, le dosage par HPLC du rapport Kynurénine/Tryptophane montre une production proche de Trp et de Kyn entre les mDC et les DCSEVPatient C et D alors que les DCExoDS et les DCSEVPatient J semblent produire plus de Kyn (**Figure 41 B**).

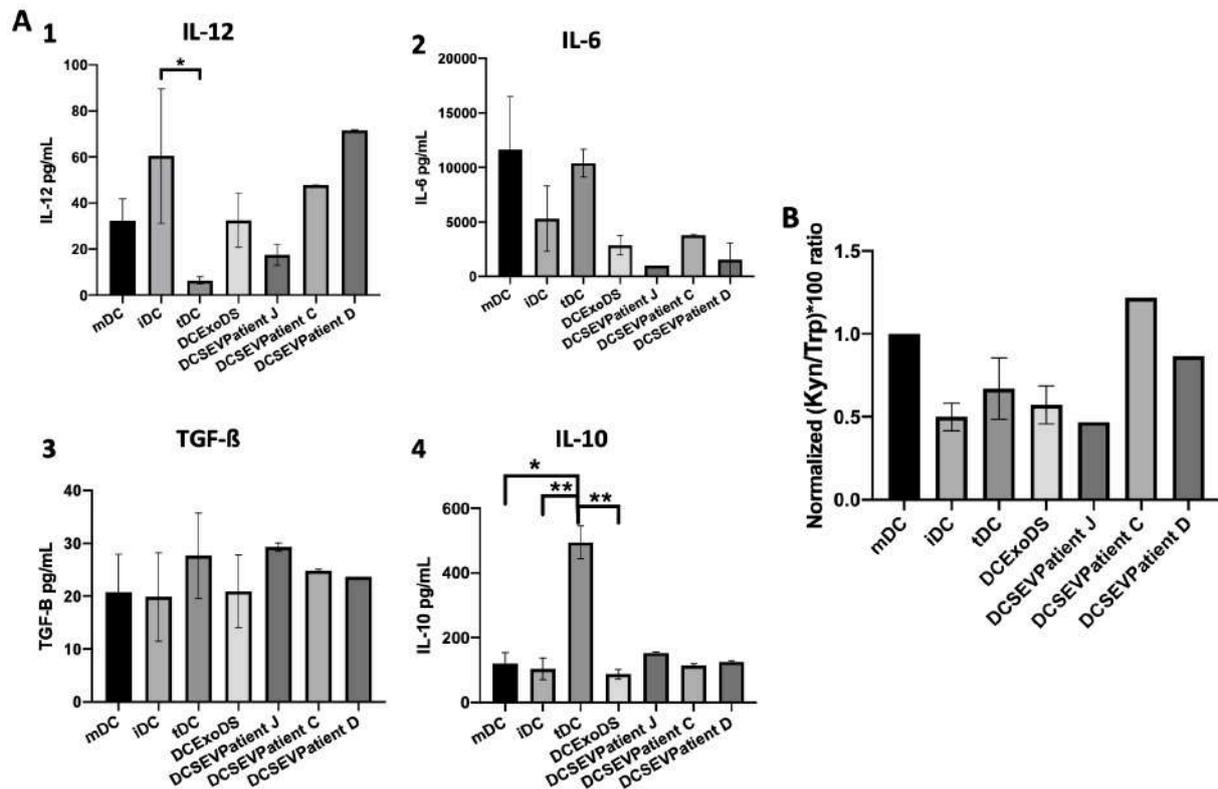


Figure 41 : Dosage des cytokines sécrétées par les moDC et étude des métabolites d'IDO après maturation. (A) Dosage de la sécrétion de cytokines par ELISA dans le surnageant de culture des monocytes et des MoDCs. (A1-2) Sécrétion des cytokines proinflammatoires IL-12 et IL-6, (A3-4) dosage des cytokines immunosuppressives TGF- β et IL-10. Les résultats sont exprimés en concentration de cytokines (pg/mL), moyenne \pm SEM. n=4 pour les mDC, iDC, tDC et DCExoDS, n=1 pour les DCSEVPatient. (B) Dosage par HPLC du Tryptophane et de la Kynurénine. Les résultats sont exprimés en ratio (Kyn/Trp) x100 normalisé sur iDC, moyenne \pm SEM. n=4 pour les mDC, iDC, tDC et DCExoDS, n=1 pour les DCSEVPatient. Toutes les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA ou par un test de Kruskal-Wallis avec * p <0.05, ** p <0,01.

L'ensemble des résultats de cette troisième partie de l'étude suggère que les SEV de patients sont également susceptibles, comme les ExoC15, de modifier la fonction des moDC. En effet, les DC générées en présence des SEV de patients activent moins les LT CD3⁺ que les mDC contrôles traduisant une propriété tolérogène de ces DC. Tout comme les DCExoc15 étudiées en première partie, les DCSEVPatient semblent présenter un phénotype mature. Enfin, au niveau du sécrétome, les DCSEVPatient semblent sécréter moins de cytokine proinflammatoire (IL-6), tout comme les DCExoC15. Ces premiers résultats sont très prometteurs et permettent de confirmer l'impact des exosomes tumoraux de CNP sur la fonction régulatrice des moDC.

Partie IV : Effet de la Galectine-9 dans la maturation des moDC

Dans les parties précédentes nous avons ajouté des éléments supplémentaires permettant de comprendre l'importance des exosomes de CNP dans la mise en place du microenvironnement immunosuppresseur et plus particulièrement dans la génération de cellules dendritiques matures régulatrices favorisant l'anergie de la réponse lymphocytaire T. Néanmoins, les processus mis en place par les exosomes ne sont pas encore totalement connus. Une cible d'intérêt pour nous est la protéine Galectine-9 (Gal-9) qui possède d'importantes propriétés immunosuppressives comme par exemple l'induction de l'apoptose des LT effecteurs par liaison à son récepteur TIM-3 et est impliquée dans l'immunosuppression du CNP (Mrizak *et al.*, 2015). De plus la Gal-9 est portée par les exosomes de CNP (Klibi *et al.*, 2009). (**Figure 20 C**). Avec ces éléments, nous avons posé l'hypothèse que la Gal-9 pouvait être un des acteurs moléculaires responsables du changement de fonction observé chez les DC générées en présence d'exosomes. Pour répondre à cette question, nous avons étudiée l'impact de l'isoforme S de la Gal-9 (Gal-9S) et de son blocage sur la maturation de DC. Le blocage de la Gal-9 a été réalisé grâce à l'utilisation d'un anticorps bloquant qui est l'1g3 (breveté par le laboratoire). Nous avons tout d'abord étudié l'effet immunosuppresseur de la Gal-9 et son blocage sur les PBMC humains avant de regarder l'impact sur la maturation des DC.

A. Effet immunosuppresseur de la Galectine-9 sur les PBMCs

Afin d'étudier l'effet suppresseur de la Gal-9, nous avons mis en culture des PBMCs humains avec de la Gal-9S recombinante (3 µg/mL) en présence ou non d'anticorps bloquant 1g3 (3 µg/mL) ou d'isotype contrôle (3 µg/mL) ainsi qu'un inhibiteur naturel de la Gal-9 le lactose (5mM). Nous avons ensuite mesuré la prolifération des PBMCs après 48h de culture (**Figure 42**). Nous pouvons observer que la Gal-9S diminue significativement la prolifération des PBMCs après 48h avec respectivement **52%** de suppression par rapport aux PBMCs activés (PBMC A) contrôles. L'utilisation de l'anticorps bloquant 1g3 permet de diminuer significativement l'effet suppresseur de la Gal-9 en restaurant 20% de prolifération. De plus, l'anticorps et l'isotype seul n'ont pas d'effet sur la prolifération des PBMC. Le lactose a permis également une restauration de la prolifération des PBMC et donc d'inhiber la Gal-9S (**Figure 42**).

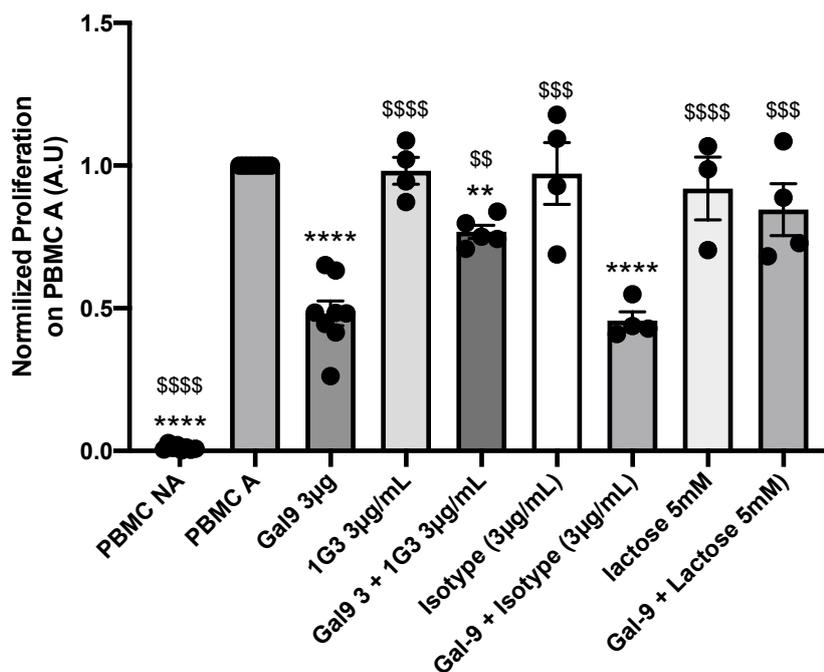


Figure 42 : Fonction suppressive et blocage de l'isoforme S de la Galectine-9. Test de prolifération des PBMCs en culture avec de la Galectine-9S (3µg/mL) avec ou sans l'anticorps bloquant de la galectine-9 (1g3) (3µg/mL) ou son isotype (3µg/mL) ou lactose (5mM) après 48h de culture. Résultats à 48h représentatifs de 8 expériences pour les PBMCs activées (PBMC A), les PBMCs non activées (PBMC NA) et les PBMCs + Gal-9S. Résultats représentatifs respectivement de 4 expériences pour les conditions avec 1g3, isotype + Gal-9S et lactose + Gal-9S, de 5 expériences indépendantes pour la condition Gal-9S + 1g3 et de 3 expériences indépendantes pour la condition lactose. Les différences statistiques entre les PBMCs A et les autres conditions sont notifiées par le symbole suivant « * » alors que celles entre la condition Gal-9S et les autres conditions sont notifiées avec le symbole « \$ ». Toutes les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA avec * ou \$ p<0.05, ** ou \$\$ p<0.01, *** ou \$\$\$ p<0.001, **** ou \$\$\$\$ p<0.0001.

Ainsi nous avons bien observé et confirmé les propriétés immunosuppressives de la Gal-9S et la capacité de l'anticorps 1g3 à inhiber ces effets.

B. Caractéristiques fonctionnelles, phénotypiques des moDC générées en présence de Gal-9 et/ou d'anticorps bloquant

Dans le but d'évaluer l'impact de la Gal-9S sur la maturation des DC, nous avons généré des DC à partir de monocytes comme expliqué dans la **Figure 22** en ajoutant dès le premier jour de culture de la Gal-9S recombinant en présence ou non de l'anticorps 1g3 (3 µg/mL), de l'isotype (3 µg/mL) ou du lactose (5mM) pendant 5 jours. La maturation a ensuite été induite comme pour les mDC par l'ajout de TNF-α et d'IL-1β pendant 2 jours.

i. Étude du phénotype des DC générées avec la Galectine-9 ou de son anticorps bloquant

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression des marqueurs membranaires de population CD11c et CD14, de maturation (CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR) ainsi que DC-SIGN par cytométrie en flux après la différenciation des monocytes en moDC. Nous avons constaté qu'après la différenciation des monocytes les différentes moDC ont une expression similaire à celle des iDC des différentes protéines membranaire (**Figure 43**).

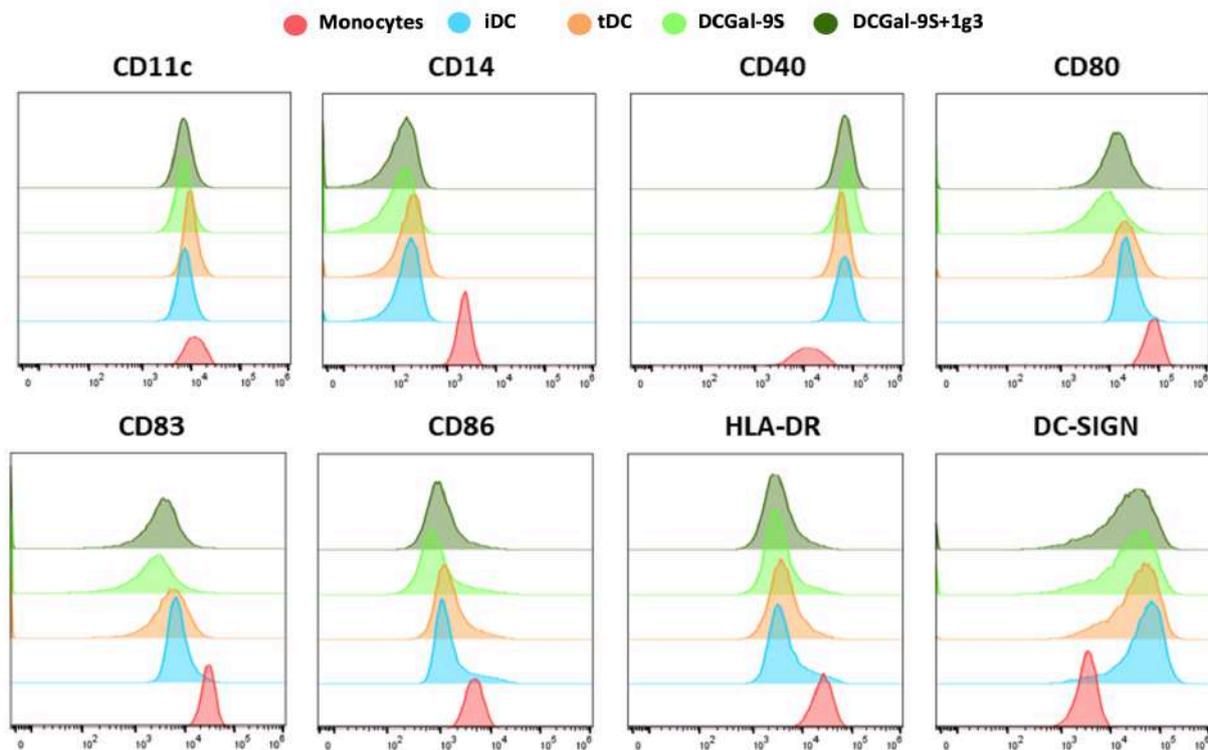


Figure 43 : Caractérisation phénotypique des moDC après différenciation. Niveau d'expression des marqueurs membranaires de surface CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, DC-SIGN dans les monocytes (Rouge), iDC (Bleu), tDC (orange), DCGal-9S (Vert clair) et DCGal-9S+1g3 (Vert foncé) après différenciation. Les graphiques sont représentatifs de 4 expériences indépendantes.

Après l'étape de maturation, nous avons étudié l'expression de ces 8 mêmes protéines membranaires. L'analyse par cytométrie en flux montre que les mDC contrôles expriment de façon plus importante la protéine HLA-DR ainsi que les protéines de costimulation CD40, CD80, CD83 et CD86 en comparaison avec les iDC et tDC. Les tDC générées à partir d'éléments chimiques (Dexaméthasone et Vitamine D3), ont un profil d'expression des protéines proche de celui des iDC. Concernant les DC générées en présence de Gal-9S (DCGal-9S), elles expriment les différentes protéines de façon similaire à nos mDC contrôles. De même

l'ajout de l'1g3 (DCGal-9S+1g3) ne semble pas modifier l'expression des différentes protéines étudiées par rapport aux mDC contrôles (**Figure 44**).

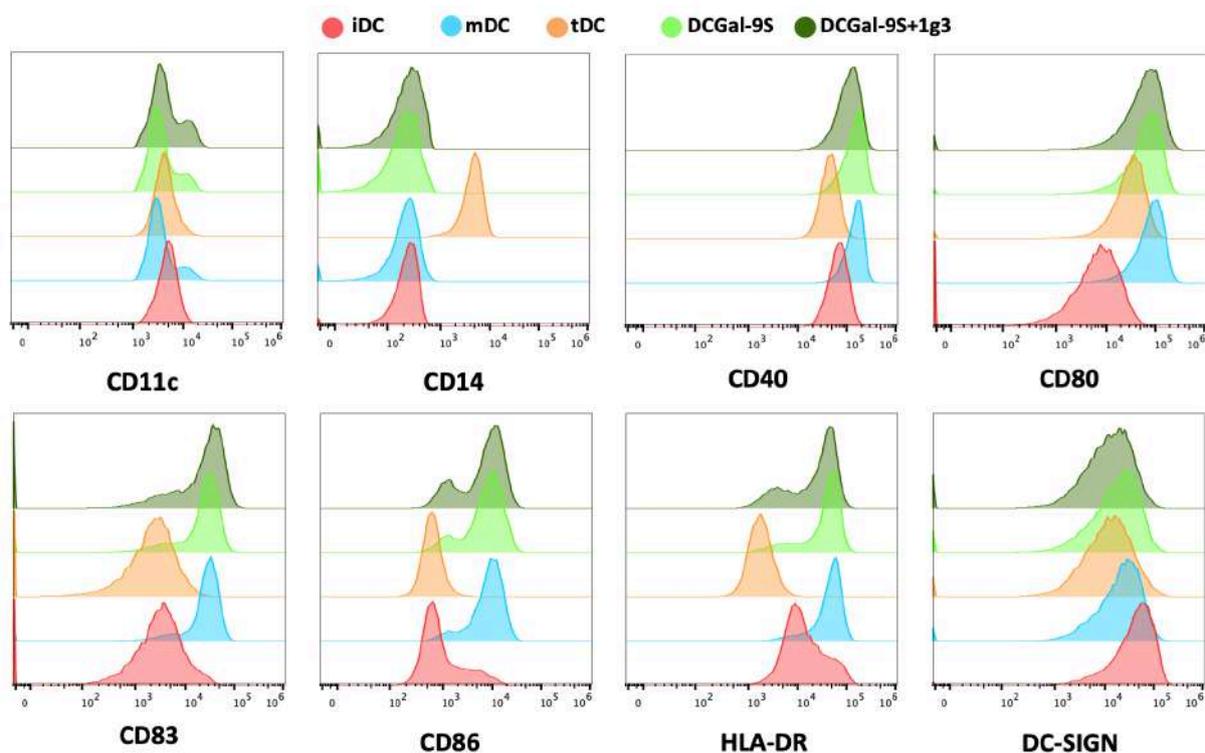


Figure 44 : Caractérisation phénotypique des moDC après maturation. Niveau d'expression des marqueurs membranaires de surface CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, DC-SIGN dans les iDC (rouge), mDC (bleu), tDC (orange), DCGal-9S (vert clair) et DCGal-9S+1g3 (vert foncé) après maturation. Les graphiques sont représentatifs de 4 expériences indépendantes.

Ainsi, la Gal-9 n'affecte pas l'expression des marqueurs de maturation des DC et favorise l'induction de DC phénotypiquement mature.

ii. Effet de la Gal-9 sur la sécrétion de cytokines par les moDC

Après l'étude phénotypique de l'impact de la Gal-9 sur la maturation par cytométrie en flux, nous avons analysé les cytokines sécrétées par les différents moDC (**Figure 45**). Nous avons dosé par ELISA la production de cytokines proinflammatoires (IL-12p70, IL-6) et immunosuppressives (IL-10 et TGF- β) après la phase de maturation (**Figure 45 A**). Nous observons que les mDC ont une production importante d'IL-12p70 et d'IL-6. Les tDC quant à elles ont une diminution de production d'IL-12p70 ainsi qu'une augmentation de production d'IL-10 attestant de leur fonction immunosuppressive. Les DCGal-9S sécrètent autant d'IL-6, d'IL-12p70, d'IL-10 et de TGF- β que les mDC contrôles. Enfin, l'ajout de l'anticorps bloquant 1g3 ne semble pas modifier la sécrétion des différentes cytokines (**Figure 45 A-D**).

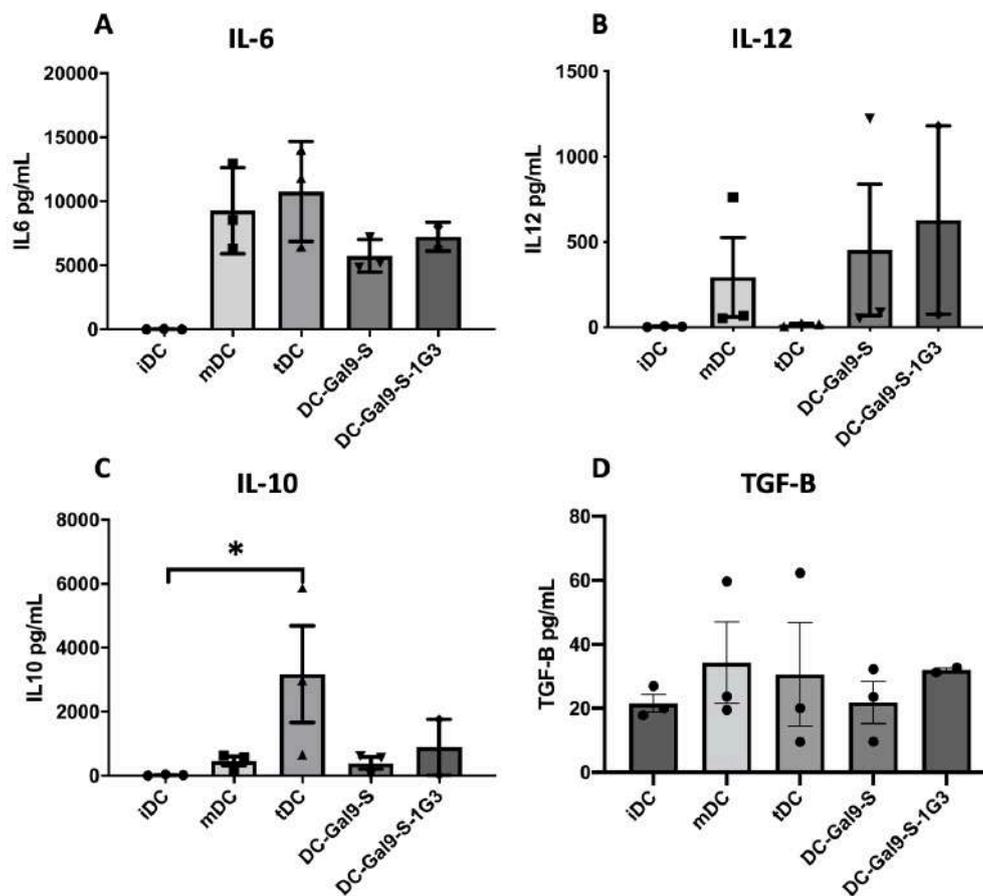


Figure 45 : Dosage des cytokines secrétées par les moDC après la maturation. (A-D) Dosage respectif de la production d'IL-12p70, d'IL-6, de TGF-β et d'IL-10 par les moDC. Les résultats sont exprimés en concentration de cytokines (pg/mL), moyen ± SEM. Toutes les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA après identifications des outlier. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Il semblerait donc que les cellules dendritiques générées en présence de Gal-9S présentent un sécrétome semblable aux mDC et donc en faveur de l'activation d'une réponse immunitaire.

iii. Effet de la Gal-9 sur les propriétés activatrices des moDC sur les LT

Après avoir étudié le phénotype et la fonction sécrétrice des moDC générées en présence de Gal-9S, nous nous sommes intéressés à la possible modification des propriétés activatrices des moDC en présence de Gal-9S. Pour cela, la fonction suppressive des moDC a été analysée par un test de prolifération de LT CD3⁺ en co-culture avec les moDC pendant 48, 72 et 96h (**Figure 46**). Les résultats obtenus montrent que les mDC induisent une prolifération significativement plus importante que les iDC traduisant leur fonction mature et activatrice des

LT. En comparaison aux mDC, les tDC induisent une diminution de prolifération des LT attestant de leur fonction tolérogène après 48h et 72h de prolifération (**Figure 46 A et B**). De façon très intéressante, les DCGal-9S induisent significativement moins de prolifération que les mDC après 48h et 72h de prolifération. De plus, l'ajout de l'1g3 permet de restaurer la prolifération des PBMC de façon significative à 72h. Cette restauration ne semble pas se faire en présence de l'isotype contrôle, mais le test n'a été effectué qu'une seule fois dans cette condition.

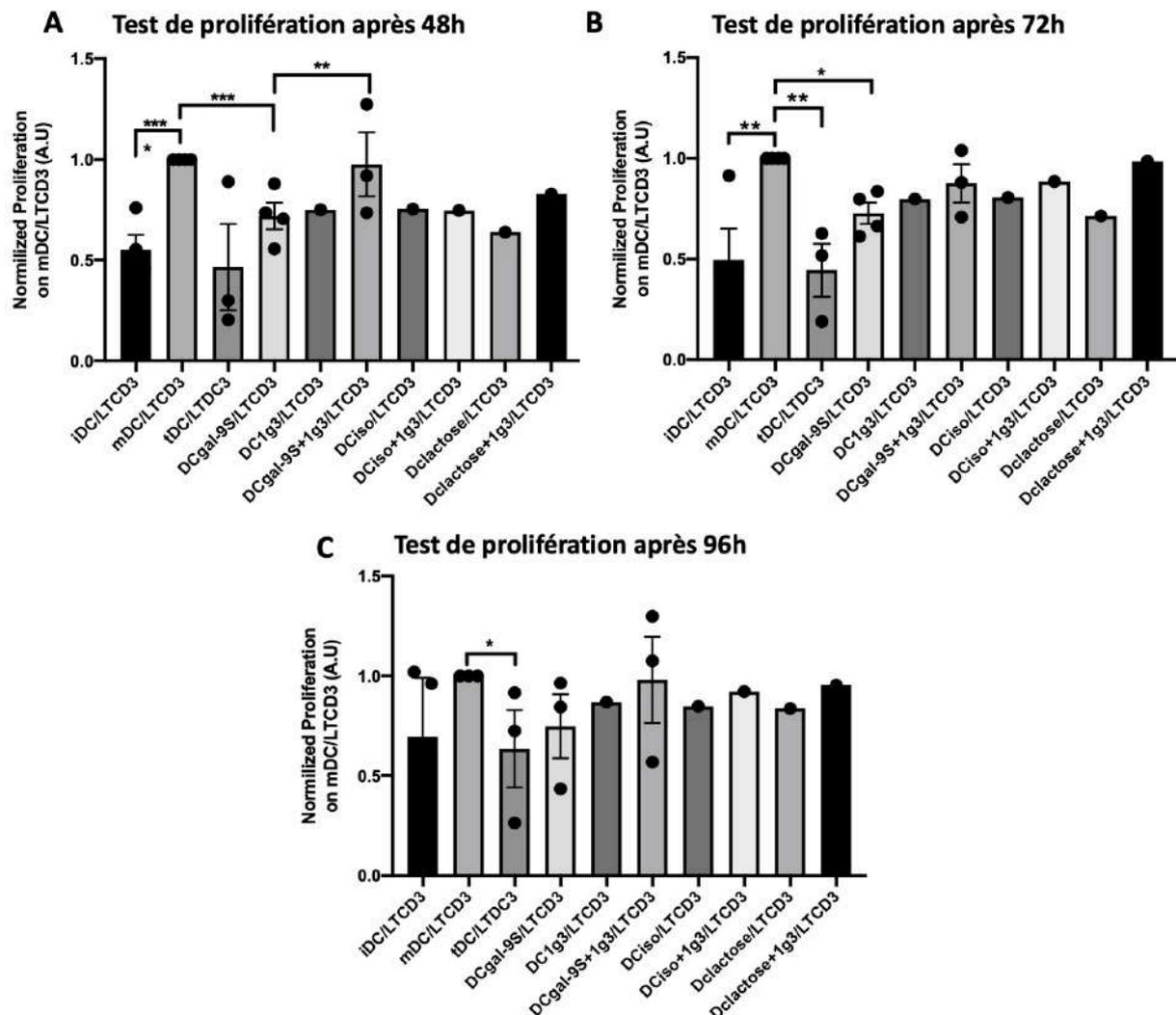


Figure 46 : Test de prolifération des LT CD3⁺ en présence de moDC. Test de prolifération des LT CD3⁺ en co-culture avec les iDC, mDC, tDC, DCGal-9S +/- 1g3, Isotype (Iso) ou lactose après 48h (A), 72h (B) et 96h (C). Les résultats sont exprimés en index de prolifération normalisés sur la condition mDC/LTCD3, moyenne ± SEM, n=4 (iDC, mDC, tDC et DCGal-9S), n=3 (DCGal-9S+1g3) à 48 et 72h. n=3 (iDC, mDC, tDC et DCGal-9S, DCGal-9S+1g3) à 96h. n=1 pour les autres conditions. Toutes les différences statistiques entre les conditions ont été analysées par un test One-Way ANOVA ou par un test de Kruskal-Wallis avec *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001.

Ainsi ces premiers résultats, évaluant l'effet de la galectine-9S sur la maturation des cellules dendritiques humaines, montrent que la galectine-9S modifie la fonction activatrice des cellules dendritiques vers une fonction régulatrice, qui peut être secondairement inhibée par l'ajout de l'anticorps bloquant 1g3 (breveté par le laboratoire).

En conclusion, l'ensemble des résultats préliminaires de cette 4^{ème} partie de l'étude suggère que la galectine-9S favorise la génération de cellules dendritiques matures ayant un sécrétome certes activateur, mais présentant un défaut d'activation des LT. Ces résultats permettent de mieux comprendre l'impact de la galectine-9 sur la maturation des DC. De façon très intéressante, l'ajout de l'anticorps bloquant (1g3) permet de contrer les effets de la galectine-9, ce qui pourrait en faire un outil pertinent pour une application immunothérapeutique dans le CNP.

Conclusion
Discussion
Perspective

CONCLUSION GENERALE

En conclusion de cette thèse, nous avons défini un nouveau mécanisme immunosuppresseur dans le CNP par l'induction de DC matures régulatrices (mregDC) par les exosomes tumoraux. Nous avons cherché à déterminer si les exosomes de CNP avaient un effet sur la maturation et la fonction des moDC. Pour cela nous avons mené des tests afin de déterminer la fonction, le phénotype et le métabolisme des moDC générées en présence des exosomes de CNP (DCExoCNP). Les tests fonctionnels d'activation de LT par les moDC montrent que les DCExoCNP rendent anergiques les LT qui prolifèrent moins en leur présence. Puis, dans le but de comprendre la cause de ce changement de fonction nous avons mené une étude phénotypique montrant un phénotype mature de ces DCExoCNP. Ainsi, la perte d'activation des LT n'est pas due à un manque d'interaction. Nous avons ensuite réalisé une étude fonctionnelle du sécrétome des moDC en examinant la production de cytokines et l'expression d'IDO. De façon intéressante, nous avons observé que les DCExoCNP ont un sécrétome en faveur de l'immunorégulation par un défaut de production des cytokines proinflammatoires IL-12 et IL-6 ainsi que la production importante de la cytokine IL-4. De plus, l'étude de l'implication d'IDO et de l'IL4I1 dans les changements de fonction à la maturation des DC montrent que les deux enzymes IDO et IL4I1 ne semblent pas impliquées dans ces changements. Néanmoins, la sécrétion de l'enzyme IL4I1 par les DCExoCNP conforte l'idée qu'il s'agit bien de mregDC comme décrit par Maier et ses collaborateurs (Maier *et al.*, 2020) montrant la production de cette enzyme comme caractéristique des mregDC. En outre, l'étude du métabolisme révèle une diminution du métabolisme oxydatif. Avec tous ces éléments nous pouvons confirmer que les DCExoCNP sont bien des mregDC. En lien avec de précédents travaux du laboratoire, nous avons étudié si les exosomes de CNP pouvaient attirer les moDC. Ces anciens travaux ont démontré la capacité des exosomes de CNP à attirer les Treg au site tumoral *via* l'axe CCL20/CCR6. Sachant que les mregDC générées en présence des exosomes expriment le récepteur CCR6, nous avons comme hypothèse l'existence d'une attraction des DC par le même axe. Ainsi, nos tests de chimioattraction ont démontré l'attraction des mregDC par les exosomes de CNP. Néanmoins, le mécanisme ne semble pas dépendant de la CCL20. La **Figure 47** représente une proposition de modèle d'établissement des mregDC et de leurs caractéristiques en présence des ExoCNP.

Parallèlement, l'émergence de mregDC par les exosomes de CNP a pu être retrouvée avec des SEV plasmatiques de patients atteints de CNP.

Enfin, dans le but de trouver par quelle voie moléculaire les exosomes induisent les mregDC, nous avons utilisé de la galectine-9 recombinante pour étudier sa capacité à bloquer la maturation des moDC de façon similaire aux exosomes tumoraux. Les résultats montrent une absence de modification du phénotype et des cytokines produites par le moDC. En revanche, les moDC en présence de galectine-9 activent moins efficacement les LT, ce qui est rétablie par l'ajout d'un anticorps bloquant la galectine-9.

Les exosomes de CNP agissent directement en bloquant la réponse T effectrice, mais également en induisant des Treg qui favorisent le maintien du microenvironnement immunosuppresseur. Ces travaux ont mis en avant un mécanisme indirect contribuant à l'évasion immunitaire du CNP. Effectivement, les exosomes de CNP induisent des mregDC qui sont capables d'inhiber l'activation des LT et les attirent au site tumoral. L'ensemble de nos résultats ont trouvé ainsi des voies intéressantes non seulement dans la compréhension de la physiopathologie du CNP mais également de nouvelles perspectives thérapeutiques via un ciblage des exosomes tumoraux qui occupent une place centrale dans la progression à la fois du CNP et du microenvironnement immunosuppresseur qui le caractérise.

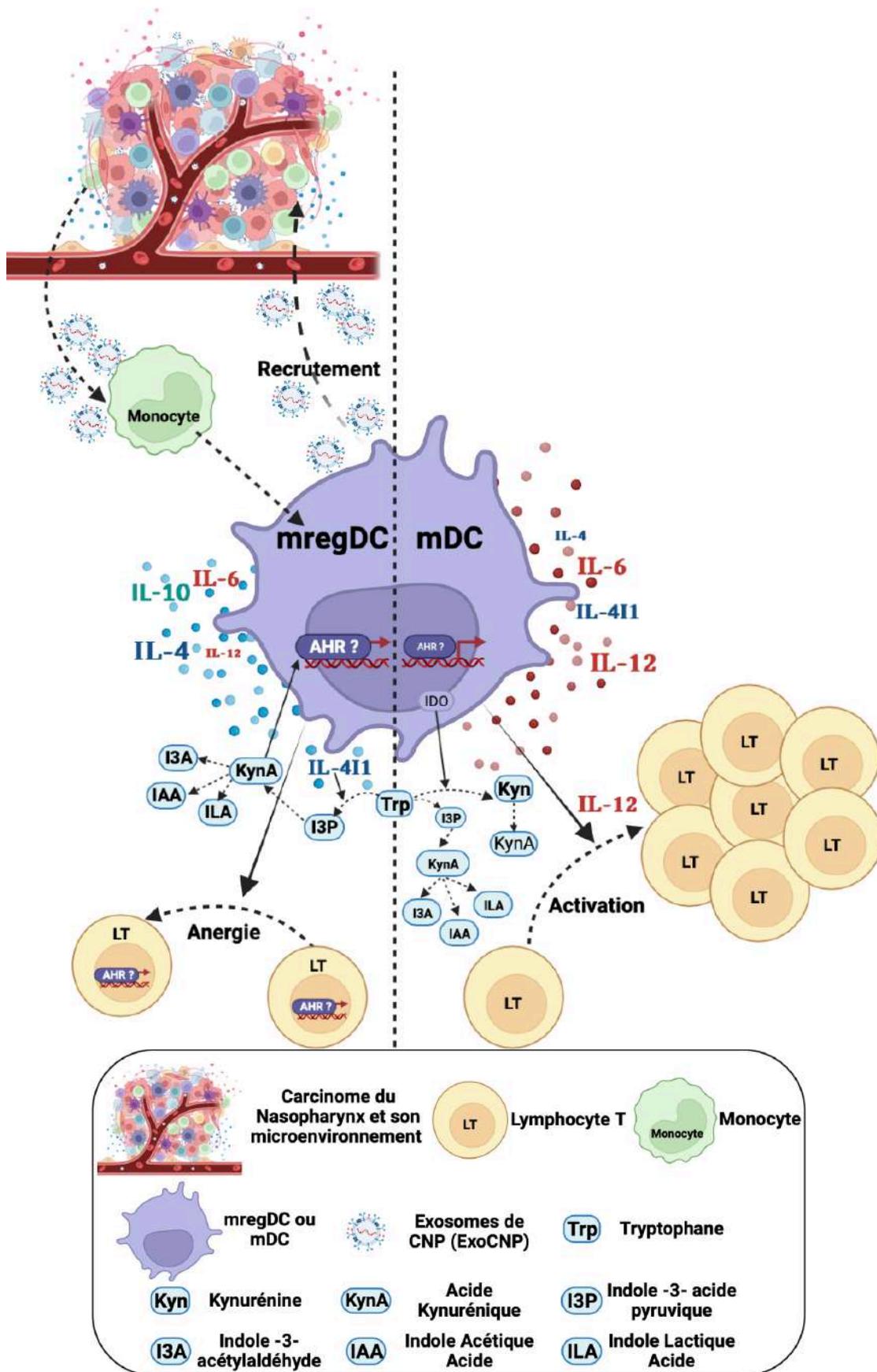


Figure 47 : Nouveau modèle d'établissement des mregDC et de leurs caractéristiques en présence des ExoCNP

DISCUSSION

Comme décrit précédemment, le carcinome du nasopharynx est une tumeur très fréquemment associée au virus d'Epstein-Barr et qui se distingue par un microenvironnement immunosuppresseur très développé dominé par la présence des lymphocytes T régulateurs et des exosomes tumoraux. Ces deux acteurs interagissent fortement pour promouvoir l'immunosuppression et la progression tumorale. Notamment, nous avons pu montrer au laboratoire que les exosomes issus des CNP (ExoCNP) favorisaient la fonction suppressive et la prolifération des Treg.

Comme exposé dans l'introduction, un des mécanismes très bien décrit permettant l'émergence des Treg fait intervenir les tDC capables de convertir les LT naïfs en Treg et rendant anergiques les T effecteurs. Les tDC ont donc un rôle central dans la mise en place de l'immunosuppression. Dans ce contexte, le but de cette étude a été d'évaluer les capacités des ExoCNP à altérer la maturation des DC afin de favoriser l'émergence de tDC. Un premier mécanisme, décrit en 2015 par notre laboratoire, consistait en l'action directe des exosomes produits par les cellules de CNP sur les LT infiltrant ou périphériques. Ainsi, les exosomes favorisent l'inhibition de la réponse effectrice par apoptose des LT effecteurs et parallèlement accentuent la réponse T régulatrice en stimulant la fonction suppressive des Treg et en convertissant les T conventionnels en Treg (Mrizak *et al.*, 2015).

Les résultats que nous avons obtenus durant cette thèse ont permis de mettre en avant un nouveau mécanisme participant à l'aggravation du microenvironnement immunosuppresseur *via* les exosomes. En effet, nous avons observé et démontré, l'implication d'un second mécanisme immunorégulateur indirect passant par l'émergence de cellules dendritiques tolérogènes. Ainsi, nous avons démontré que les exosomes de CNP interagissent avec les monocytes lors de leur différenciation et maturation en cellules dendritiques pour générer des cellules dendritiques matures régulatrices (mregDC). Ces mregDC induites par les exosomes de lignées cellulaires de CNP, mais également de patients atteints de CNP, bloquent l'activation de la réponse immunitaire en rendant anergiques les LT.

Plus précisément les exosomes provoquent des changements cytokiniques des monocytes en induisant une sécrétion importante des cytokines IL-10 et IL-6 ainsi qu'une activité de l'enzyme IDO. Cette activité d'IDO est responsable de la déprivation en tryptophane environnant et de sa métabolisation en kynurénique, un métabolite bio-actif responsable d'effets suppressifs par activation du facteur de transcription AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor). Puis,

après la phase de maturation le profil cytokinique varie en faveur d'une perte de sécrétion des cytokines proinflammatoires IL-12 et IL-6. Parallèlement les mregDC produisent la cytokine IL-4. Enfin, ces exosomes modifient le métabolisme oxydatif des mregDC les rendant moins susceptibles d'utiliser cette voie pour produire de l'énergie. On peut supposer que ce changement puisse être en faveur de la glycolyse plus facile à réaliser dans un environnement hypoxique.

En plus, de l'attraction des Treg au site tumoral décrit par Mrizak *et al* (Mrizak *et al.*, 2015), nous avons démontré que les exosomes attirent les mregDC pour contribuer à l'établissement du microenvironnement immunosuppresseur. Néanmoins, cette attraction ne semble pas dépendant de la chimiokine CCL20 comme décrit pour l'attraction des Treg par Mrizak *et al* (Mrizak *et al.*, 2015).

Enfin, pour commencer à identifier les facteurs exosomaux responsables des modifications fonctionnelles des DC, nous avons étudié le rôle de la galectine-9 (Gal-9). En effet, la galectine-9 est une lectine possédant des propriétés immunosuppressives et qui est produite en quantité importante dans les tissus tumoraux de CNP et en particulier par les exosomes de CNP. La Gal-9 ne modifie pas le phénotype et la sécrétion de cytokines par les DC mais semblent activer de manière moins efficace les LT lors d'une co-culture. Enfin, de façon intéressante, l'ajout d'un anticorps bloquant la Gal-9 semble restaurer les capacités activatrices des DC sur les LT, suggérant un rôle de cette molécule dans le mécanisme d'action des exosomes de CNP.

L'ensemble de nos résultats entrouvrent ainsi des voies intéressantes non seulement dans la compréhension de la physiopathologie du CNP mais également de nouvelles perspectives thérapeutiques via un ciblage des exosomes tumoraux.

Les exosomes tumoraux de CNP jouent un rôle sur le développement des cellules dendritiques humaines en induisant la génération de mregDC

Il est maintenant clairement établi que les populations de DCs sont hétérogènes en termes d'ontogénie et de fonction. Diverses études démontrent que les DC peuvent à la fois stimuler et réguler l'activation des populations de cellules T. Parmi les DC régulatrices, les tDC régulent notre réponse immunitaire, nous empêchant de développer des maladies auto-immunes et permettant une tolérance immunitaire périphérique. Les tDC peuvent être caractérisées par leur phénotype semi-mature (expression plus faible des marqueurs de co-stimulation tels que

CD40, CD80, CD83 et CD86 et par des niveaux plus élevés de DC-SIGN) et leur capacité à bloquer la réponse LT effectrice tout en favorisant la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Patente *et al.*, 2018). Ces dernières années, de nouvelles technologies de séquençage, notamment les analyses Single cell, ont permis d'identifier à travers les différentes lignées de DC un programme commun au DC nommé " DCs matures enrichies en molécules immunorégulatrices " ou DCs matures régulatrices (mregDC) (Zilionis *et al.*, 2019; Maier *et al.*, 2020; Kvedaraite and Ginhoux, 2022). Les mregDC sont caractérisées par une signature moléculaire spécifique à la maturation des DC (CD40, CD80, CD86), à la migration (CCR7 et ICAM) ainsi qu'aux molécules d'immunosuppression (PD-L1, PD-L2, CD200) (Maier *et al.*, 2020). De plus, Maier *et al.* ont décrit l'existence du programme mregDC par les cellules dendritiques conventionnelles de type 1 et 2 (DC1 et DC2) qui ont une fonction de régulation immunitaire pour éviter une suractivation. Il est intéressant, de noter que dans le contexte tumoral, les mregDC peuvent avoir une fonction pro-tumorale et notamment présenter un défaut d'expression et de production d'IL-12. Les auteurs rapportent également le rôle négatif de l'IL-4 sécrétée par les mregDC. En effet, l'IL-4 tient un rôle central dans l'inhibition des fonctions effectrices des mregDC, notamment *via* le blocage de la sécrétion de l'IFN- γ , elle-même nécessaire à la production d'IL-12 (Maier *et al.*, 2020). De plus, la relation entre la croissance tumorale et l'IL-4 a été rapportée pour de nombreux types de cancer exprimant le récepteur à l'IL-4 (IL-4R) y compris le CNP (Shurin *et al.*, 1999; Budiani, Haryana and Sosroseno, 2011). Budiana et ses collègues ont signalé une augmentation de la production d'IL-4 à la fois au niveau de la tumeur et dans le sérum des patients atteints de CNP par rapport aux témoins (Budiani, Haryana and Sosroseno, 2011). L'IL-4 joue un rôle essentiel dans le développement des tumeurs, étant associée à l'agressivité et au potentiel métastatique (Kobayashi *et al.*, 1998). Les études les plus récentes indiquent que l'IL-4 endogène peut favoriser la résistance à l'apoptose *via* la signalisation IL4-R (Li *et al.*, 2008).

Au cours de cette thèse, nous avons montré que les exosomes dérivés de CNP induisent une altération du développement des DC favorisant la génération de mregDC. En effet, les DCExoC15 présentent un phénotype mature avec l'expression des marqueurs de présentation antigénique (HLA-DR) ainsi que des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD83 et CD86) en accord avec la description des mregDC (Maier *et al.*, 2020; S. Cheng *et al.*, 2021). De plus, au niveau fonctionnel, les DCExoC15 mettent en place des mécanismes immunorégulateurs avec la production d'IL-10 et d'IDO lors de la phase de différenciation suivi par un défaut de sécrétion des cytokines activatrices IL-12, IL6 en faveur d'une production

importante d'IL-4. Enfin les DCExoC15 induisent une anergie des LT CD3 en co-culture qui se retrouvent significativement moins activés attestant des capacités régulatrices de ces cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux de Maier *et al.* qui montrent la capacité des exosomes de CNP à altérer la maturation des moDC en générant des mregDC participant à l'établissement du microenvironnement immunosuppresseur.

Les DCExoC15 produisent de l'IL-10 et ont une enzyme IDO active lors de la phase de différenciation

Nous avons pu observer, dans la première partie de ces travaux, un profil cytokinique et enzymatique particulier des DCExoC15 par rapport aux autres moDC contrôles générées. En effet, nous avons observé, lors de la différenciation en DC en présence d'ExoCNP, une augmentation importante de la production d'IL-10 et une activité de l'enzyme IDO importante. Cette production d'IL-10 et cette activité IDO pourraient être liées à la présence de l'oncogène d'EBV, la protéine LMP1, retrouvé sur les ExoC15 de CNP. En effet, il a été décrit que dans son premier domaine transmembranaire, LMP1 possède une séquence immunosuppressive conservée LALLFWL responsable de la production d'IL-10 par les cellules immunitaires (Haraguchi, Good and Day, 1995; Dukers *et al.*, 2000). De manière identique, Tsai *et al.* ont décrit qu'LMP1 exprimé dans les cellules B peut inhiber la réponse humorale et augmenter l'expression et l'activité d'IDO1 par l'activation de la voie NF-kB (Chaves *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 2018, p. 1). De plus, il a été démontré que les métabolites du tryptophane produits par l'IDO sont capables de convertir les DC immunogènes en tDC (Belladonna *et al.*, 2006). L'IFN- γ induit l'activation d'IDO dans les tDC, résultant en une tolérance par l'induction d'une privation de tryptophane et la production de kynurénine. En retour, les tDC sécrètent de la kynurénine pour activer la réponse régulatrice d'autres DC dans lesquelles l'enzyme IDO n'est pas active. Ainsi, ces DC induites dans des conditions de faible teneur en tryptophane et de métabolite élevé peuvent conduire à la désactivation des LT, la génération de Treg et donc à la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale (Von Bubnoff *et al.*, 2011). Gargaro *et al.* ont même montré que les cellules cDC1 exprimant IDO développent leur capacité immunorégulatrice vers la sous-population cDC2 grâce à la production de kynurénine (Gargaro *et al.*, 2022). Ainsi la production d'IL-10 et l'activation de d'IDO dans les DC apparaissent comme les premiers mécanismes immunorégulateurs de ces cellules induites en présence d'exosomes de CNP.

L'IL-4 joue un rôle dans la production d'IL-12 et d'IDO par les moDC après la maturation

Nous avons identifié des mécanismes cytokiniques immunorégulateurs mis en place lors de la différenciation des monocytes en moDC en présence d'ExoC15 et il en est de même suite à la maturation de DCExoC15. En effet, après le stade de maturation, les DCExoC15 ont montré une production réduite de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-12. Ce défaut de production de cytokines inflammatoires notamment IL-6 et IL-12 a déjà été observé par d'autres équipes. En ce sens, Ning *et al.* ont démontré que les exosomes du carcinome pulmonaire de Lewis (LLC) ont altéré la différenciation des DC qui produisent moins d'IL-6 et d'IL-12 (Ning *et al.*, 2018). Outre l'absence de production d'IL-12 par les DCExoC15, les résultats de RT-qPCR de l'expression d'IDO ainsi que l'analyse du Trp et de son métabolite Kyn montrent que l'enzyme IDO est très peu exprimée et est beaucoup moins active dans ces DC par rapport aux mDC contrôles. De plus, il a été décrit l'implication de l'IL-4 dans le contrôle de la régulation de l'IL-12 produit par les DC ainsi que dans l'expression et l'activité d'IDO (Musso *et al.*, 1994; Maier *et al.*, 2020). En effet, Maier *et al.* montrent que les mregDC ne produisent plus d'IL-12 au détriment d'une production d'IL-4 et lors de l'inhibition de l'IL-4 à l'aide d'un anticorps bloquant, la production d'IL-12 est permise (Maier *et al.*, 2020). Il est très intéressant de noter que les DCExoC15 ont la capacité de sécréter beaucoup plus d'IL-4 que les autres moDC générées, qu'elles soient matures ou tolérogènes.

Concernant IDO, un lien entre l'IL-4 et IDO a été décrit. En effet, l'IL-4 par sa capacité à contrer la signalisation de l'IFN- γ , est capable de réduire la production d'IDO induite par l'IFN- γ . Les auteurs décrivent que cette caractéristique s'accompagne d'une diminution des cytokines inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF- α (Musso *et al.*, 1994). L'ensemble de nos résultats indique clairement que ces DCExoCNP appartiennent à ce sous-type de mregDC récemment décrit et que la sécrétion d'IL-4 est sans doute impliquée dans le défaut de sécrétion d'IL-12 ainsi que dans la diminution d'activité d'IDO. De plus, Kiss et ses collaborateurs ont décrit un lien direct entre l'IL-4 et LMP1. Dans les lignées de lymphomes de Hodgkin et de lymphomes de Burkitt, la production d'IL-4 est responsable de l'induction d'expression de LMP1, même en l'absence d'EBNA2 *via* l'activation de STAT6 (Kis *et al.*, 2011). Les cellules mettent en place une boucle de rétrocontrôle de LMP1 *via* l'IL-4 afin de favoriser la transformation des LB par EBV. Récemment, il a été décrit dans le contexte d'une infection chronique par le coxsackievirus B3 que la galectine-9 favorisent l'anergie des LT CD4 et favorise l'émergence des Treg ainsi que la production d'IL-10 et d'IL-4 (Lv *et al.*, 2011). On peut donc supposer que dans le contexte

inflammatoire de la tumeur la production de galectine-9, libre ou bien portée par les exosomes, pourrait permettre la progression tumorale par son rôle inhibiteur de la voie Th1 et par la sécrétion de cytokines régulatrices de la voie Th2 comme l'IL-4. Ensuite, l'IL-4 pourrait induire l'expression et la production de l'enzyme IL4I1 bien connue pour ces fonctions immunosuppressives (Molinier-Frenkel, Prévost-Blondel and Castellano, 2019). Ainsi, bloquer l'IL-4 pourrait diminuer son impact sur l'expression de LMP1 et sur la production des cytokines proinflammatoires permettant un rétablissement des fonctions activatrices des cellules dendritiques.

IL4I1, un relais possible, remplaçant IDO dans la régulation induite par les moDC après la maturation ?

Récemment, pour tenter de comprendre l'échec de l'essai clinique de phase III ciblant IDO associé au blocage des points de contrôles immunitaires, Sadik *et al* ont décrit l'implication du gène 1 induit par l'interleukine 4 (IL4I1 : une enzyme sécrétée appartenant à la famille des L-amino-acides oxydases). Ils décrivent que l'enzyme IL4I1 est capable de promouvoir la capacité d'immunosuppression du cancer induite par les récepteurs des aryl-hydrocarbures (AHR) de manière plus puissante que l'IDO1 ou la TDO2, reconnues jusqu'à présent comme les principales enzymes cataboliques du Trp (Boulland *et al.*, 2007; Sadik *et al.*, 2020). En outre, l'expression d'IL4I1 est directement liée à la progression tumorale et à la résistance dans différents cancers, car les patients présentent des concentrations accrues de métabolites que l'on peut désormais attribuer à IL4I1, non seulement dans le tissu tumoral mais aussi dans les fluides biologiques (Fong, McDunn and Kakar, 2011; Locasale *et al.*, 2012; J. Huang *et al.*, 2016).

Parmi les cellules immunitaires, les APC et notamment les DC sont une des sources les plus puissantes d'IL4I1. La présence de cellules productrices d'IL4I1 dans le microenvironnement tumoral restreint la réponse immunitaire anti-tumorale en limitant directement la prolifération et la fonctionnalité des cellules T cytotoxiques et des cellules Th1, ou indirectement en facilitant l'accumulation de Treg. Ainsi, l'IL4I1 est une molécule jouant un rôle majeure dans le contrôle immunitaire (Molinier-Frenkel, Prévost-Blondel and Castellano, 2019). Enfin, Maier *et al.*, dans leur dernière description des mregDC indique que, IL4I1 était régulé à la hausse parmi d'autres marqueurs Th2. Dans l'ensemble, ces informations soutiennent que l'augmentation de l'IL4 et par conséquent la sécrétion d'IL4I1 représentent une véritable caractéristique des mregDC, expliquant leur rôle néfaste dans la progression et la résistance au cancer (Maier *et al.*, 2020).

De plus, nous savons que l'IL4I1 active la voie AHR par la génération d'oncométabolites indoliques et d'acide kynurénique à partir du tryptophane. La mesure de la quantité de ces métabolites (acide kynurénique, acide acétique indole et acide lactique indole) montre qu'il n'y a pas de différence dans les quantités de métabolites indoliques et d'acide kynurénique entre les DCExoC15 et les mDC. De même, nous avons remarqué une expression génique d'IL4I1 ainsi qu'une production similaire de celle-ci par les DCExoC15 en comparaison aux mDC.

Ainsi, ces résultats montrent que l'immunosuppression induite par les DCExoC15 ne passe pas par une production accrue de l'enzyme IL4I1 ainsi que des métabolites produits par cette dernière.

Les exosomes de CNP induisent une modification métabolique des DC

L'importance du métabolisme dans les capacités immunogènes ou tolérogènes des cellules immunitaires est de mieux en mieux décrit. Les cellules en cours de maturation utiliseront la phosphorylation oxydative (l'OXPHOS) et la glycolyse puis uniquement la glycolyse si le stimulus est suffisamment important pour inhiber l'OXPHOS. Inversement les tDC auront plus tendance à utiliser l'OXPHOS et l'oxydation des acides gras (FAO) permettant de fournir des précurseurs aux cycle de Krebs qui *in fine* génèrera de l'ATP par l'OXPHOS (Pearce and Everts, 2015). Nous avons donc étudié l'utilisation de deux voies métaboliques dans nos moDC, l'OXPHOS et la glycolyse. Les analyses indiquent une capacité réduite des DCExoC15 à utiliser le métabolisme oxydatif comme source d'énergie avec une consommation d'oxygène basale, maximale ainsi qu'une SRC plus faible que les mDC.

Concernant la glycolyse les premiers résultats ne semblent pas montrer de différence par rapport aux mDC. De plus, il a été précédemment décrit, par Santos et ses collègues, que, dans le contexte du cancer hépatocellulaire (CHC), les DCs exposées à l' α -fétoprotéine présentent une réduction du métabolisme des acides gras et du métabolisme mitochondriale avec une réduction du taux basal de consommation d'oxygène (Santos *et al.*, 2019). Ces modifications expliquent en partie un mécanisme responsable de la suppression immunitaire dans le CHC. Il est donc tout à fait possible que cette baisse du métabolisme oxydatif dans les DCExoC15 puisse être en partie responsable du manque d'activation des LT par ces DC, en raison d'une capacité réduite à produire l'énergie nécessaire aux différentes réactions intervenant dans l'activation des LT.

Dans ce contexte, des analyses complémentaires sont nécessaires pour appréhender en détail les modifications métaboliques des DCExoCNP. En effet, le métabolisme des acides gras est également bien décrit comme une voie utilisée par les cellules régulatrices, y compris les DCs régulatrices, pour réaliser leur fonction suppressive et induire une suppression immunitaire (Zeyda *et al.*, 2005; Pearce and Everts, 2015). La voie d'oxydation des acides gras utilise les acides gras qui seront dégradés pour fournir les précurseurs nécessaires au fonctionnement du cycle de Krebs et ainsi à l'OXPPOS. Une diminution de l'OXPPOS pourrait dans ce cas être induit par une baisse de fonctionnement du métabolisme des acides gras. Les mécanismes de suppressions nécessitent un apport énergétique important. Dans cet environnement hypoxique en absence de dioxygène, les cellules doivent s'adapter métaboliquement pour continuer à réaliser leur fonction.

Les exosomes tumoraux de CNP exercent une attraction sur les mregDC

La chimiokine CCL20 (MIP-3 α , macrophage inflammatory protein-3 α) est une chimiokine qui occupe une place importante dans le CNP en favorisant l'invasion et la migration des cellules de CNP (Chang *et al.*, 2008). En effet, elle est retrouvée dans les séra des patients et est depuis considérée comme un biomarqueur de détection et de réponse aux traitements dans le CNP. Chang et ses collaborateurs ont ainsi montré, dans une cohorte de patients, que la CCL20 était surexprimée dans les cellules tumorales (Chang *et al.*, 2008). De plus, les taux sériques de cette chimiokine sont significativement plus importants chez les patients non traités, avec un CNP récurrent ou présentant des métastases en comparaison à des sujets sains, en rémission complète ou présentant une longue survie sans maladie (Chang *et al.*, 2008). Ces observations ont été confortées dans une autre étude plus récente montrant également dans une cohorte de patients une association de cette chimiokine à une mauvaise survie globale (Cai *et al.*, 2014). En outre, l'axe faisant intervenir la CCL20 et son récepteur (CCR6) a été identifié dans la progression tumorale et le développement d'un microenvironnement immunosuppresseur (Kadomoto, Izumi and Mizokami, 2020).

Des travaux antérieurs de l'équipe, réalisés à la fois *in vitro* et *in vivo*, ont démontré que les ExoCNP porte la CCL20 à leur membrane et sont capables de recruter des Treg au site tumoral de façon dépendant de la chimiokine CCL20 (Mrizak *et al.*, 2015). Nous nous sommes donc demandé si par un mécanisme analogue, les moDC pouvaient être attirées par les ExoCNP. Nos résultats démontrent ici que les ExoCNP attirent préférentiellement les DCExoCNP par rapport aux mDC, ce qui pourrait renforcer le microenvironnement suppressif présent dans le

CNP. Cependant les DCExoCNP, ne semblent pas être attirées par la CCL20 bien qu'elles expriment le récepteur CCR6 comme nous l'avons observé. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ce résultat et parallèlement nous pourrions bloquer la CCL20 présente sur les exosomes pour étudier la modification d'attraction des DCExoCNP.

Outre la chimiokine CCL20, une autre voie qui pourrait être intéressante est celle qui met en jeu la chimiokine CCL2 également appelée MCP-1 (Monocytes chemoattractant protein-1) ainsi que son récepteur CCR2. CCL2 est impliquée dans diverses fonctions protumorales comme l'induction de la prolifération ainsi que les métastases (Yang *et al.*, 2016). Elle régule également l'infiltration et la migration de différentes populations immunitaires comme les monocytes, les cellules NK et les LT (Singh, Anshita and Ravichandiran, 2021). Dans le contexte du CNP différents travaux rapportent le rôle de l'axe CCL2/CCR2 dans le développement tumoral. Yang *et al* ont mis en évidence une augmentation d'expression de CCL2 dans les tumeurs de CNP récurrentes. Dans ces mêmes cellules une production autocrine de CCL2 favorise l'EMT, les métastases par le biais de l'activation des voies ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2-MMP2/9 (Yang *et al.*, 2016). Huajiao et ses collaborateurs rapportent également l'implication de CCL2 dans la croissance du CNP et qu'une inhibition de Notch1 permet une diminution de la croissance et des métastases *via* une baisse d'expression de CCL2, CXCL16 et uPA (urokinase plasminogen activator) (Guo *et al.*, 2019).

De façon intéressante, dans les cellules de CPN EBV⁺ l'oncogène majeur d'EBV LMP1 est capable d'induire l'expression de MCP-1 par l'activation de la voie NF- κ B et dans les cellules EBV⁻ CD40, il permet une expression transitoire de cette chimiokine (Buettner *et al.*, 2007). Tous ces éléments montrent l'impact et le rôle de l'axe CCL2/CCR2 dans le développement du CNP et suggère que cet axe pourrait intervenir, *via* les exosomes, sur l'attraction des monocytes ou des DC au niveau tumoral.

Les exosomes de CNP et les chimiokines CCL19 et CCL20 n'induisent pas la migration des tDC générées *in vitro*

De manière intéressante, nous avons observé lors de nos expériences que les tDC ne migrent pas sous l'effet des exosomes de CNP ou des chimiokines CCL19 et CCL20. En outre, les résultats de RT-qPCR ont montré une baisse significative de l'expression du récepteur à la CCL19, CCR7 dans les tDC ce qui peut expliquer l'absence d'attraction pour cette chimiokine. En ce sens, une autre équipe a montré des résultats similaires selon lesquels les tDC générés

avec de la vitamine D3 ou de la dexaméthasone ne migrent pas vers le gradient CCL19 et présentent une sous-expression de CCR7 (Barragan, Good and Kolls, 2015; Adnan *et al.*, 2016).

Parallèlement des tDC générées par d'autres protocoles, notamment avec du TGF- β , garde une expression de CCR7 et sont ainsi capable d'être attiré par la CCL19. Mais ceci n'explique pas le manque de motricité qu'on observe dans toutes les conditions expérimentales. L'utilisation de la vitamine D3 et de la dexaméthasone pour générer les tDC serait à l'origine du manque de capacité migratoire. En effet, il a été démontré que les glucocorticoïdes comme la dexaméthasone sont capables de provoquer un réarrangement des microtubules ainsi que celle des filaments d'actine-F dans les LT conduisant à une dépolarisation des cellules empêchant leur migration (Müller *et al.*, 2013). La même action a été décrite dans les cellules souches mésenchymateuses qui perdent leur comportement migratoire après un traitement à la dexaméthasone (Schneider *et al.*, 2015). Il en serait donc de même pour les tDC ainsi générées *in vitro*, une étude complète de l'état du cytosquelette permettrait de lever le voile sur cette question.

La galectine-9 semble jouer un rôle au cours de la maturation des moDC

Dans cette partie du manuscrit, nous nous sommes intéressés au rôle de la galectine-9 sur la maturation et la fonction des moDC. En effet, dans le contexte du CNP un autre candidat particulièrement intéressant est la galectine-9, qui est retrouvé sur les exosomes des CNP (Keryer-Bibens *et al.*, 2006) et qui possède diverses capacités immunosuppressives ayant un impact considérable sur la réponse antitumorale. La galectine-9 est connue pour se lier à l'un de ses récepteur TIM-3 sur les lymphocytes T effecteurs et ainsi entrainer leur apoptose (Zhu *et al.*, 2005). De plus, elle provoque l'inhibition de la voie Th17, la diminution de sécrétion des cytokines proinflammatoires IL-17, IL-12 et IFN- γ (Seki *et al.*, 2008) ainsi que la génération des MDSC et des iTreg (Seki *et al.*, 2008; C *et al.*, 2014; C.-X. Zhang *et al.*, 2020). Cependant, malgré ces effets immunosuppresseurs décrits, les études sur la galectine-9 montrent des résultats controversés avec une association négative ou bien positive avec le pronostic des patients dépendant du contexte tumoral. Notamment, l'expression de la galectine-9 est associée à de mauvais pronostic dans le carcinome à cellules rénales ou dans la leucémie myéloïde aiguë (Jikuya *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Au contraire, une augmentation de la galectine-9 est associée à un bon pronostic dans de nombreux cancers solides tels que le cancer du côlon ou le carcinome hépatocellulaire (Fujita

et al., 2015; X. Zhou *et al.*, 2018; Morishita *et al.*, 2021). Dans le cas d'une association à un bon pronostic, il a été montré que la galectine-9 possédait la capacité de limiter l'attachement et l'invasion des cellules tumorales réduisant ainsi les facultés métastatiques des tumeurs (Nobumoto *et al.*, 2008). Concernant l'impact de la galectine-9 sur les DC, peu d'études se sont penchées sur cette question. Néanmoins, les différents travaux rapportent plutôt un effet positif de la galectine-9 qui favorise la maturation des DC et joue un rôle dans l'internalisation de pathogène médié par les récepteurs aux lectines de type-C (Yamauchi *et al.*, 2005; Querol Cano *et al.*, 2019).

Concernant nos résultats, en accord avec Yamauchi *et al.*, nous observons une expression importante des marqueurs de présentation antigénique et de co-stimulation ainsi qu'une production des cytokines proinflammatoires IL-12 et IL-6. Néanmoins, les DC que nous générons en présence de l'isoforme S de la galectine-9 activent moins efficacement les LT ce qui est rétabli par l'ajout d'un anticorps bloquant la galectine-9, suggérant un impact de cet axe. Ces premiers résultats nous ont amené à l'hypothèse selon laquelle la galectine-9 exogène pourrait se retrouver à la surface des DC notamment aux niveaux des dendrites et pourrait inhiber les LT lors de l'interaction DC/LT au moment de la synapse immunologique.

En lien avec la première partie de cette thèse, nous souhaitons évaluer le rôle de la galectine-9 exosomale dans l'induction des mregDC participant à la mise en place du microenvironnement immunosuppresseur. En effet, il a été démontré dans d'autres études que les exosomes tumoraux portant cette galectine pouvaient être corrélés au pronostic des patients. Ainsi, les exosomes isolés de patient atteints de NSCLC ont une plus grande quantité d'exosomes Gal-9⁺ que des donneurs sains. Ces exosomes Gal-9⁺ sont corrélés directement avec la taille de la tumeur, le stade de développement et le statut métastatique (Gao *et al.*, 2018). De plus, les d'exosomes Gal-9⁺ modulent le microenvironnement tumoral favorisant la progression de la tumeur. Dans le cas du CNP, ces exosomes sont capables d'interagir avec le récepteur TIM3 sur les LT CD4⁺ spécifiques de l'EBV afin d'induire l'apoptose de ces cellules (Klibi *et al.*, 2009).

Mais qu'en est-il de l'impact de la galectine-9 exosomale sur la maturation et la fonction des DC ? Dans le contexte du CNP aucune étude n'a rapporté le rôle de la galectine-9 exosomale sur le devenir des DC. En revanche, des études de ce genre ont été réalisées dans d'autres modèles de cancer. Il a notamment été décrit que les exosomes isolés du liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients atteints de glioblastome multiforme (GBM) contiennent de la galectine-9 qui peut interagir avec le récepteur TIM3 sur les DC (Ming *et al.*, 2020). Cette

interaction inhibe la reconnaissance, le traitement et la présentation de l'antigène par les DCs infiltrant la tumeur, ce qui entraîne l'échec de la réponse immunitaire antitumorale médiée par les LT cytotoxiques (Ming *et al.*, 2020). De plus, il a été démontré l'importance de l'interaction galectine-9/TIM3 dans la régulation de la fonction des cellules dendritiques dans le cancer. Le blocage du récepteur TIM3 sur les cellules dendritiques cDC1 dans le cancer du sein a montré une amélioration de la réponse anti-tumorale après chimiothérapie en favorisant la réponse LT CD8⁺ intratumorale médiée par l'expression de la chimiokine CXCL9. Le blocage de la galectine-9 dans ce même modèle a montré les mêmes résultats que les anti-TIM3 avec une augmentation de l'expression de CXCL9 confirmant l'interaction entre ces deux acteurs dans l'effet de modulation des DC (de Mingo Pulido *et al.*, 2018). La galectine-9 est également connue pour se lier à d'autres récepteurs comme notamment CD44. Concernant les Treg induits, la fixation de la galectine-9 à CD44 permet la stabilité de l'interaction CD44/TGF- β RI favorisant l'expression de Foxp3 suite à l'augmentation de la phosphorylation de Smad3. Parallèlement, Smad3 stimule l'expression de Foxp3 et de la galectine-9 (Wu *et al.*, 2014).

Outre l'induction de Treg, il a été montré dans un modèle murin de cancer pancréatique que la galectine-9 participait à la croissance tumorale en se liant à la lectine 1 perturbant la maturation de macrophages et donnant un phénotype tolérogène M2 (Daley *et al.*, 2017; Lv, Bao and Li, 2017). Ainsi, à la lumière des données de la littérature et des résultats obtenus quant à l'effet de la galectine-9 exogène sur les DC et, il est tout à fait envisageable que la galectine-9 (présente sur les exosomes de CNP) puisse jouer un rôle, *via* son interaction avec un de ces récepteur TIM3, dans la modification des DC que nous observons (Wolf, Anderson and Kuchroo, 2020). Ainsi, par le biais d'un blocage de la galectine-9 (anticorps bloquant, 1g3) qui permettrait d'inhiber l'interaction galectine-9/TIM3, les exosomes pourraient être une cible intéressante pour l'immunothérapie des patients atteints de CNP.

PERSPECTIVES

Utilisation d'autres lignées de CNP et utilisation d'exosomes dérivés d'un plus grand nombre de patients atteints d'un CNP à différents grades

Une première perspective de cette étude serait de confirmer ces résultats dans d'autres lignées de CNP comme les lignées C17 et C666 afin d'observer les capacités des exosomes qui en dérivent (ExoC17 et ExoC666 respectivement) à induire des mregDC. Des travaux préliminaires du laboratoire montrent, concernant les ExoC17, des propriétés immuno-suppressives sur les PBMC humains et l'absence de modification du phénotype des moDC induites en leur présence. Des travaux complémentaires seraient nécessaires pour conclure sur la fonction activatrice ou régulatrice de ces moDC. De plus, il est intéressant de noter que les exosomes issus du plasma de patients de CNP donnent des DC avec un défaut d'activation des LT, comme nous l'avons observé avec les ExoC15. Dans un premier temps il s'agirait de réitérer ces expériences sur un plus grand nombre d'échantillons de patients pour confirmer ces premiers résultats. Les observations montrent qu'il pourrait être intéressant de cibler les exosomes dans le traitement du CNP. La difficulté sera de cibler les exosomes sans créer de dommages dans les cellules saines voisines. Malheureusement, un marqueur spécifique des exosomes tumoraux n'existe pas ou du moins n'a pas encore été décrit. A l'heure actuelle les exosomes sont plus utilisés comme marqueurs diagnostic et pronostic pour la stratification des patients et le suivi de la réponse aux traitements (Kim *et al.*, 2018; Yan, Fu and Ming, 2018; Mannavola *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2020).

Par quelle voie les exosomes de CNP induisent-ils les mregDCExoCNP ?

Connaissant les effets des exosomes de CNP sur les DC (DCExoCNP) et l'induction de mregDC, il est intéressant de se demander quelles voies moléculaires sont impliquées. Premièrement, il faut s'intéresser au déroulement de l'interaction entre les exosomes et les monocytes. *Les exosomes fusionnent-ils avec la membrane ou sont-ils internalisés ? Est-ce que le modèle d'interaction décrit par Nanbo et al. dans l'internalisation d'EVs dérivées de cellules B en latence I et III à savoir une endocytose dépendante des cavéoles est également le mécanisme en place dans notre modèle d'étude ?* Si les exosomes sont effectivement internalisés alors il est tout à fait possible que les facteurs affectant les monocytes soient contenus dans les exosomes comme des miARN ou bien des protéines. Outre l'internalisation, les exosomes pourraient interagir directement avec un récepteur à la surface des monocytes. Il

a été décrit l'existence d'interaction entre les monocytes et les exosomes mais le mécanisme en question reste toujours inexpliqué (Weiss *et al.*, 2018). Ainsi, l'utilisation de la microscopie confocale à haute résolution et/ou l'utilisation de la cytométrie en flux couplée à l'imagerie, pourraient nous permettre de visualiser une possible internalisation ou fusion membranaire des exosomes.

Dans quelle mesure la Galectine-9 est-elle impliquée dans les mécanismes d'action des exosomes de CNP ?

L'un de nos candidats dans l'effet des exosomes sur les DC est la galectine-9. Comme abordé dans l'introduction, elle est présente sur les exosomes de CNP et est impliquée dans différents processus immunorégulateurs. Des résultats récents du laboratoire ont montré une contribution dans la fonction suppressive des Treg et nous avons observé dans cette thèse que la galectine-9 perturbe l'activation des LT par les DC. De plus l'utilisation d'un anticorps bloquant la galectine-9 breveté par le laboratoire a montré un effet dans le rétablissement de l'activation des LT. Bien que sur les DC le rôle de la galectine-9 soit controversé il est intéressant de noter que la galectine-9 présente sur les exosomes peut avoir un effet sur la présentation antigénique des DC (Ming *et al.*, 2020). Ainsi, bloquer la galectine-9 présente sur les exosomes de CNP serait la prochaine étape de cette étude et permettrait d'élucider l'implication possible de la galectine-9 dans les effets des exosomes sur la différenciation et la maturation des DC. Des travaux préliminaires du laboratoire ont montré la capacité de notre anti-Gal9 à inhiber la fonction suppressive des exosomes dérivés de la lignée C17 de CNP sur les PBMC humains. Il pourrait être intéressant d'évaluer l'effet d'un blocage de la galectine-9 sur la production d'IL-4 et d'IL411 par les DCExoCNP permettant d'apprécier le rôle de cette protéine dans ce processus immunosuppresseur. Ces objectifs font notamment partis des travaux menés par Camille TRIÖEN étudiante en thèse au laboratoire.

L'oncogène majeur d'EBV, LMP1, est-il impliqué dans les mécanismes d'action des exosomes de CNP ?

Une autre cible possible est la protéine de latence virale LMP1, cette protéine virale est spécifiquement retrouvée sur les exosomes de CNP. En effet, LMP1 est dérégulée dans de nombreux cancers dont le CNP et est impliquée dans plusieurs voies majeures des cellules tumorales, telles que la prolifération, la survie, la dissémination métastatique, la résistance et

l'immunosuppression (Dawson, Port and Young, 2012). De plus, Pioche-Durieu *et al.* ont démontré une interaction entre LMP1 et galectine-9 dans les radeaux membranaires (Pioche-Durieu *et al.*, 2005). Pour tester cette piste, bloquer LMP1 sur les exosomes permettrait de déterminer son implication dans l'induction des mregDC médiée par les exosomes de CNP. LMP1 est une protéine transmembranaire avec les parties N-ter et C-ter situées en intracellulaire et de petites boucles extracellulaires ce qui rend son ciblage complexe. Peu d'études se sont penchées sur le ciblage de LMP1. Néanmoins, certains se sont intéressés au blocage de LMP1 avec des anticorps neutralisants. Par exemple, Paramita *et al.* ont développé des anticorps ciblant LMP1 en immunisant des lapins avec des peptides spécifiques des domaines extracellulaires de LMP1, permettant la lyse induite par le complément d'environ 35-55 % des cellules B infectées par EBV (Paramita *et al.*, 2011). Une autre équipe a mis au point des anticorps à partir de peptides provenant de deux boucles extracellulaires de LMP1, présentant des activités antitumorales remarquables chez la souris (Delbende *et al.*, 2009). Enfin, une dernière équipe a créé un immunoconjugué (HLEAFab-MCC) en conjuguant la mitomycine avec un fragment Fab humain spécifique des domaines extracellulaires de LMP1. Cette immunoconjugué a montré un effet contre les cellules de CNP en tuant les cellules positives pour LMP1 et en inhibant les xénogreffes de CNP dans le souris NUDE (Chen *et al.*, 2012). A noter que l'ensemble de ces études ont développées des anticorps spécifiques des boucles extracellulaire de LMP1.

Récemment un nouvel outil a été décrit faisant intervenir des petites protéines appelées Affibody. Les Affibody sont une classe de petites protéines (6,5 kDa), non immunoglobulines, générées avec trois hélices du domaine Z dérivé de la protéine A du staphylocoque et pouvant être combinées avec des séquences peptidiques spécifiques de protéines cibles (Andersson *et al.*, 2016; Ståhl *et al.*, 2017). Ainsi, dans une publication récente, Kamara, Yanru *et al* on générées trois Affibody se liant spécifiquement au domaine C-terminal de LMP1 (ZLMP1-C15, ZLMP1-C114 et ZLMP1-C277) et pouvant être utilisés pour l'imagerie moléculaire spécifique du CNP (Kamara *et al.*, 2021). De plus, cette même équipe montre dans son dernier papier en prépublication que ces Affibody spécifiques de LMP1 peuvent diminuer la voie MEK/ERK/p90RSK provoquant l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales de CNP à la fois *in vitro*, mais également *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffes de CNP (Yanru *et al.*, 2022). Si ces résultats sont confirmés par une publication, alors il pourrait être très intéressant d'utiliser ce type de molécule pour cibler LMP1 dans les exosomes, et dans les traitements des pathologies malignes, voire infectieuses, associées à EBV.

Des miARN spécifiques sont-ils transportés par les exosomes et responsables de leur effet immunosuppresseurs ?

Les effets immunosuppresseurs des exosomes de CNP pourraient également être médiés par des miARN. En effet, il a été montré que les exosomes de CNP contiennent des miARN qui contribuent au développement du CNP (Y. Zhou *et al.*, 2018). Ye *et al.* ont par ailleurs montré que les miR-24-3p, miR-891a, miR-106a-5p, miR-20a-5p, et miR-1908 altèrent la prolifération et la différenciation des LT. Le miR-24-3p module la phosphorylation des protéines ERK et STAT altérant la prolifération des LT, la différenciation des TH1 et TH17 et favorisant en retour la différenciation des Treg Foxp3+ (Ye *et al.* 2014 ; 2016). Hormis ces miARN, il est bien décrit l'existence de miARN BART au sein des exosomes de CNP (Gourzones *et al.*, 2010). Notamment, dans les exosomes de la lignée C15, ont été retrouvés les miR-BART1-5p, 5, 7, 12 et 13 avec une présence plus importante des miR-BART1-5p et miR-BART7 (Gourzones *et al.*, 2010). Ces miARN ont une place centrale dans le développement du CNP. En effet, miR-BART1-5p va permettre la mise en place de la glycolyse aérobie dans les cellules de CNP favorisant leur croissance (Lyu *et al.*, 2018).

L'Immune checkpoint LILRB4, présent sur les DCExoC15, peut-il constituer une cible en immunothérapie ?

Les immunes checkpoints jouent un rôle primordial dans la régulation de la réponse immunitaire. Ces derniers permettent l'inhibition de la réponse des LT antitumorale en diminuant la production des perforines et granzymes et en inhibant de l'apoptose des cellules tumorales. Récemment, Sharma *et al.* ont mis en évidence que LILRB4 (ILT3) fonctionne comme un immune checkpoint (Sharma *et al.*, 2021). En effet, LILRB4 est présent dans différentes tumeurs et corrèle avec une croissance tumorale et un infiltrat immunitaire immunosuppresseur. En ce sens, l'utilisation d'anti-LILRB4 a permis la mise en place d'un infiltrat immunitaire principalement effecteur avec la présence de LT effecteur Th1 et une diminution du phénotype épuisé des LT CD8 faisant de LILRB4 une cible d'intérêt pour d'éventuelles immunothérapies (Sharma *et al.*, 2021). Il est également intéressant de noter que les DCExoC15 expriment de façon importante LILRB4. Nous pouvons donc nous demander si un blocage de ce point de rétrocontrôle diminuerait les propriétés régulatrices des DCExoC15.

Les DCExoCNP induisent-elles la génération de Treg et si oui des Treg de quel type ?

Une autre partie de cette étude qui mériterait d'être éclairée est la capacité des DC générées avec les exosomes de CNP à induire des Treg. En effet l'une des caractéristiques des DC tolérogène est l'induction de Treg en plus de l'anergie des LT effecteurs. De même, le cross-talk entre DC/Treg renforce aussi bien le pouvoir suppressif des trg que l'engagement des DC vers une voie régulatrice. Dans cette étude, nous observons bien l'anergie des LT, mais nous n'avons pas encore étudié le phénotype et la fonction des LT suite à la co-culture en présence de DC modifiées par les exosomes. En effet, on pourrait supposer qu'une partie des LT pourraient changer de phénotype pour opter pour un profil de LT régulateur et ainsi accroître l'immunosuppression. Pour vérifier cela nous pourrions dans un premier temps, analyser le phénotype des LT après co-culture par analyse de marqueurs membranaire par cytométrie en flux. Nous pourrions également cultiver des LT naïfs avec les mregDC et étudier d'une part leur phénotype et d'autre par leur fonction activatrice ou inhibitrice de la réponse immunitaire par des tests de prolifération des LT naïfs en co-culture avec des PBMC humains. Des premiers résultats ont été générés, et semblent indiquer un phénotype de type Treg périphériques induits ; ils seront bien entendu à réitérer et à compléter par l'étude fonctionnelle des Treg.

L'enzyme IDO est-elle impliquée dans la régulation des LT par les DC ?

Un mécanisme, très bien décrit dans l'induction des Treg par les DC, se fait par le biais de l'enzyme IDO. IDO provoque une déplétion du Trp en faveur de la Kyn provoquant l'anergie et la mort des LT effecteurs et l'émergence des Treg. Néanmoins, nous observons dans ces travaux que IDO est uniquement présente dans les DC au moment de la différenciation et non suite au processus de maturation. Ainsi nous pouvons nous demander si IDO n'a pas un effet précoce lors du développement des DC. En effet, lors de la phase de différenciation des moDC en présence d'ExoCNP, nous avons remarqué une présence importante de l'enzyme. En lien avec cela, nous avons constaté une concentration plus élevée en kynurénine qu'en tryptophane notant d'une activité d'IDO et donc d'une déprivation du milieu en tryptophane. Or il a été décrit que les métabolites du tryptophane produits par l'IDO sont capables de convertir les DC immunogènes en tDC (Belladonna *et al.*, 2006). Ces DC induites dans des conditions de faible teneur en tryptophane et de métabolite élevé peuvent conduire à la désactivation des LT, la génération de Treg et donc à la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale (Von

Bubnoff *et al.*, 2011). Ainsi, il pourrait être intéressant d'inhiber l'action d'IDO lors de cette phase de différenciation des moDC pour étudier les effets sur la fonction des moDC et ainsi apprécier leur capacité activatrice ou inhibitrice des LT.

Quelles perspectives pour la chimioattraction des DC ou des monocytes ?

Nous avons vu, dans cette étude, que les exosomes de CNP attirent les DCExoCNP, mais cette attraction ne semble pas dépendante de la chimiokine CCL20. Dans un premier temps nous devrions confirmer cela par l'inhibition de la CCL20 présente sur les exosomes à l'aide d'un anticorps ciblant spécifiquement CCL20, comme réalisée précédemment dans les travaux de notre laboratoire (Mrizak *et al.*, 2015). Le blocage spécifique de cette chimiokine confirmerait ou non l'implication de la CCL20 dans ce mécanisme. Un autre mécanisme pourrait être intéressant faisant intervenir l'axe CCL2/CCR2. Cet axe est notamment impliqué dans la migration des monocytes (Singh, Anshita and Ravichandiran, 2021). Ainsi les monocytes attirés depuis la périphérie au site tumoral pourraient, en contact avec les exosomes, se différencier en mregDC et participer activement au microenvironnement immunosuppresseur. Les exosomes pourraient également induire ces mregDC à partir des monocytes en périphérie et ensuite attirer les DC au site tumoral. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la présence de la chimiokine CCL2 sur les exosomes de CNP sachant que les cellules de CNP peuvent la produire (Guo *et al.*, 2019). De même, il serait pertinent d'évaluer l'expression de CCR2 sur les DC générées en présence d'exosomes tumoraux de CNP, d'autant que le rôle de CCR2 a déjà été décrit dans la migration des DC, notamment en réponse à des particules de gaz d'échappement de diesel (Provoost *et al.*, 2012). Des travaux complémentaires sont donc nécessaires pour étudier l'impact de cette voie dans l'attraction des DC par les exosomes.

Comment valider notre hypothèse et nos résultats dans un modèle *in vivo* murin de CNP ?

Une validation de nos résultats *in vivo* dans un modèle murin aiderait à évaluer l'importance de ce phénomène dans le développement du CNP. Dans un modèle de souris SCID, xénotreffées avec des cellules de CNP, et dont le système immunitaire aura été reconstitué par l'ajout de cellules immunitaires primaires humaines, nous injecterions les DCExoCNP (mregDC) autologues. Ensuite, nous évaluerions la croissance des tumeurs et l'infiltrat immunitaire. Des

analyses par cytométrie en flux ou par immunohistochimie permettraient de déterminer si le nombre de mregDC et de Treg évoluent au cours de la croissance tumorale.

Les modifications du métabolisme des DCExoCNP sont-elles impliquées dans leur fonction régulatrice ?

Le métabolisme occupe une place centrale dans la réponse immunitaire et il est admis maintenant que des changements métaboliques sont caractéristiques de l'état fonctionnel des cellules. Dans cette étude, nous avons réalisé une étude préliminaire du métabolisme en analysant le métabolisme oxydatif et glycolytique des moDC et des DCExoCNP. Les DCExoCNP montrent une baisse du métabolisme oxydatif. Afin de comprendre la cause de cette diminution, il serait intéressant d'étudier par cytométrie en flux les paramètres relatifs aux mitochondries comme la charge mitochondriale, le potentiel de membrane mitochondriale ainsi que la présence d'espèces réactive de l'oxygène. Parallèlement, une étude de la voie d'oxydation des acides gras (FAO) pourrait compléter nos premières observations. En effet, une diminution de l'OXPPOS comme observée peut être due à une diminution de la FAO qui fournit des précurseurs importants au fonctionnement du métabolisme oxydatif. Ces différentes expériences permettraient de mieux comprendre les changements métaboliques des DCExoCNP et pourraient mettre en évidence un lien avec les modifications fonctionnelles de ces cellules.

Quel est l'impact de la thérapie photodynamique sur les exosomes de CNP et les DC ?

La thérapie photodynamique (PDT) est un traitement basé sur l'association d'une molécule photosensibilisante (PS), d'une lumière d'une longueur d'onde spécifique du PS et dépendante de la présence d'oxygène. Ces trois éléments ensemble sont nécessaires et permettent la production d'espèces réactives de l'oxygène aboutissant à la mort des cellules tumorales par apoptose, nécrose ou encore autophagie. L'un des effets intéressants de la PDT est la destruction préférentielle des cellules tumorales menant à la libération d'antigènes tumoraux et de signaux de dangers (DAMPs) qui pourront être reconnus par les cellules immunitaires et activer une réponse antitumorale spécifique. Notre équipe s'intéresse à l'effet de la PDT sur la croissance tumorale et plus particulièrement sur la régulation de réponse immunitaire qui peut se mettre en place suite à ce traitement. Des travaux antérieurs de l'équipe ont pu montrer dans le contexte

de la carcinose péritonéale ovarienne que la PDT induisait la libération de vésicules extracellulaires (EVs) tumorales susceptibles d'activer les cellules immunitaires (Baydoun *et al.*, 2020). L'étude de l'effet de la PDT sur la fonction des EVs de CNP et des DC est une perspective intéressante. *Est-ce que la PDT dans le CNP permet de moduler la fonction des exosomes, ou tout autre vésicule extracellulaire produite, de CNP en faveur de propriétés effectrices ? Est-ce que les EVs suite à la PDT sont toujours capables de générer des mregDC ?* Toutes ces questions font partie de la thèse de Camille TRIOËN et pourront nous apporter davantage de réponses quant à l'utilisation et l'efficacité potentielle de la PDT dans le traitement des CNP.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- A, H. *et al.* (2019) 'EBV miRNA expression profiles in different infection stages: A prospective cohort study', *PloS one*, 14(2). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212027>.
- Abbott, R.J. *et al.* (2017) 'Asymptomatic Primary Infection with Epstein-Barr Virus: Observations on Young Adult Cases', *Journal of Virology*, 91(21), pp. e00382-17. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00382-17>.
- Abe, M. *et al.* (2018) 'Dietary inflammatory index and risk of upper aerodigestive tract cancer in Japanese adults', *Oncotarget*, 9(35), pp. 24028–24040. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25288>.
- Accardi, R. *et al.* (2015) 'The mycotoxin aflatoxin B1 stimulates Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in in vitro and in vivo experimental models', *Carcinogenesis*, 36(11), pp. 1440–1451. Available at: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv142>.
- Adnan, E. *et al.* (2016) 'Human tolerogenic dendritic cells generated with protein kinase C inhibitor are optimal for functional regulatory T cell induction - A comparative study', *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 173, pp. 96–108. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.09.007>.
- Albanese, M. *et al.* (2016) 'Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), pp. E6467–E6475. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1605884113>.
- Ambrosio, M.R. *et al.* (2014) 'The Epstein Barr-encoded BART-6-3p microRNA affects regulation of cell growth and immuno response in Burkitt lymphoma', *Infectious Agents and Cancer*, 9, p. 12. Available at: <https://doi.org/10.1186/1750-9378-9-12>.
- Amoroso, R. *et al.* (2011) 'Quantitative studies of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs provide novel insights into their regulation', *Journal of Virology*, 85(2), pp. 996–1010. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01528-10>.
- Amyes, E. *et al.* (2003) 'Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection', *The Journal of Experimental Medicine*, 198(6), pp. 903–911. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20022058>.
- Anderson, A.E. *et al.* (2017) 'Tolerogenic dendritic cells generated with dexamethasone and vitamin D3 regulate rheumatoid arthritis CD4+ T cells partly via transforming growth factor- β 1', *Clinical and Experimental Immunology*, 187(1), pp. 113–123. Available at: <https://doi.org/10.1111/cei.12870>.
- Andersson, K.G. *et al.* (2016) 'Feasibility of imaging of epidermal growth factor receptor expression with ZEGFR:2377 affibody molecule labeled with 99mTc using a peptide-based cysteine-containing chelator', *International Journal of Oncology*, 49(6), pp. 2285–2293. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3721>.
- Apcher, S. *et al.* (2009) 'mRNA translation regulation by the Gly-Ala repeat of Epstein-Barr

virus nuclear antigen 1', *Journal of Virology*, 83(3), pp. 1289–1298. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01369-08>.

Apcher, S. *et al.* (2010) 'Epstein Barr virus-encoded EBNA1 interference with MHC class I antigen presentation reveals a close correlation between mRNA translation initiation and antigen presentation', *PLoS pathogens*, 6(10), p. e1001151. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001151>.

Ariza, M.-E. *et al.* (2009) 'The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(2), pp. 851–859. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.851>.

Ascherio, A. and Munger, K.L. (2016) 'Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update', *Seminars in Neurology*, 36(2), pp. 103–114. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579693>.

Ataide, M.A. *et al.* (2022) 'Inflammasome activation and CCR2-mediated monocyte-derived dendritic cell recruitment restrict Legionella pneumophila infection', *European Journal of Immunology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1002/eji.202249985>.

Austyn, J.M. *et al.* (1988) 'Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone', *The Journal of Experimental Medicine*, 167(2), pp. 646–651. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.167.2.646>.

Azmi, A.S., Bao, B. and Sarkar, F.H. (2013) 'Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review', *Cancer Metastasis Reviews*, 32(3–4), pp. 623–642. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9441-9>.

Azzi, T. *et al.* (2014) 'Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis', *Blood*, 124(16), pp. 2533–2543. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-553024>.

Babcock, G.J. *et al.* (1998) 'EBV persistence in memory B cells in vivo', *Immunity*, 9(3), pp. 395–404. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80622-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80622-6).

Babcock, G.J., Hochberg, D. and Thorley-Lawson, A.D. (2000) 'The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell', *Immunity*, 13(4), pp. 497–506. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00049-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00049-2).

Bachem, A. *et al.* (2010) 'Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), pp. 1273–1281. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20100348>.

Baer, R. *et al.* (1984) 'DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome', *Nature*, 310(5974), pp. 207–211. Available at: <https://doi.org/10.1038/310207a0>.

Balfour, H.H., Sifakis, F., *et al.* (2013) 'Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among individuals aged 6-19 years in the United States and factors affecting its acquisition',

The Journal of Infectious Diseases, 208(8), pp. 1286–1293. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jit321>.

Balfour, H.H., Odumade, O.A., *et al.* (2013) ‘Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students’, *The Journal of Infectious Diseases*, 207(1), pp. 80–88. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis646>.

Bao, L. *et al.* (2018) ‘Metastasis-associated miR-23a from nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes mediates angiogenesis by repressing a novel target gene TSGA10’, *Oncogene*, 37(21), pp. 2873–2889. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0183-6>.

Baráth, S. *et al.* (2006) ‘Immunoregulatory T cells in the peripheral blood of patients with Hodgkin’s lymphoma’, *Acta Haematologica*, 116(3), pp. 181–185. Available at: <https://doi.org/10.1159/000094678>.

Barger, J.F. *et al.* (2016) ‘Extracellular miRNAs as biomarkers in cancer’, *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 98(Pt A), pp. 66–72. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.010>.

Barragan, M., Good, M. and Kolls, J.K. (2015) ‘Regulation of Dendritic Cell Function by Vitamin D’, *Nutrients*, 7(9), pp. 8127–8151. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu7095383>.

Battle, E. and Massagué, J. (2019) ‘Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer’, *Immunity*, 50(4), pp. 924–940. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>.

Baumforth, K.R.N. *et al.* (2008) ‘Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin’s lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells’, *The American Journal of Pathology*, 173(1), pp. 195–204. Available at: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070845>.

Baydoun, M. *et al.* (2020) ‘Photodynamic Therapy Using a New Folate Receptor-Targeted Photosensitizer on Peritoneal Ovarian Cancer Cells Induces the Release of Extracellular Vesicles with Immunoactivating Properties’, *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), p. 1185. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9041185>.

Beaulieu, S. *et al.* (2002) ‘Expression of a functional eotaxin (CC chemokine ligand 11) receptor CCR3 by human dendritic cells’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(6), pp. 2925–2936. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.2925>.

Bei, J.-X. *et al.* (2010) ‘A genome-wide association study of nasopharyngeal carcinoma identifies three new susceptibility loci’, *Nature Genetics*, 42(7), pp. 599–603. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.601>.

Bei, J.-X. *et al.* (2016) ‘A GWAS Meta-analysis and Replication Study Identifies a Novel Locus within CLPTM1L/TERT Associated with Nasopharyngeal Carcinoma in Individuals of Chinese Ancestry’, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 25(1), pp. 188–192. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055->

9965.EPI-15-0144.

Belladonna, M.L. *et al.* (2006) ‘Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(1), pp. 130–137. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.130>.

Bellassai, N. *et al.* (2019) ‘Surface Plasmon Resonance for Biomarker Detection: Advances in Non-invasive Cancer Diagnosis’, *Frontiers in Chemistry*, 7, p. 570. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00570>.

Bentz, G.L. *et al.* (2010) ‘Epstein-Barr virus BRLF1 inhibits transcription of IRF3 and IRF7 and suppresses induction of interferon-beta’, *Virology*, 402(1), pp. 121–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.03.014>.

Bevan, M.J. (1976) ‘Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay’, *The Journal of Experimental Medicine*, 143(5), pp. 1283–1288. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.143.5.1283>.

Bickham, K. *et al.* (2003) ‘Dendritic cells initiate immune control of epstein-barr virus transformation of B lymphocytes in vitro’, *The Journal of Experimental Medicine*, 198(11), pp. 1653–1663. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20030646>.

Bitra, A. *et al.* (2018) ‘Crystal structure of murine 4-1BB and its interaction with 4-1BBL support a role for galectin-9 in 4-1BB signaling’, *The Journal of Biological Chemistry*, 293(4), pp. 1317–1329. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.814905>.

Bjornevik, K. *et al.* (2022) ‘Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis’, *Science (New York, N.Y.)*, 375(6578), pp. 296–301. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>.

Blake, N. *et al.* (2000) ‘The importance of exogenous antigen in priming the human CD8+ T cell response: lessons from the EBV nuclear antigen EBNA1’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(12), pp. 7078–7087. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.7078>.

Blanchard, P. *et al.* (2015) ‘Chemotherapy and radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma: an update of the MAC-NPC meta-analysis’, *The Lancet. Oncology*, 16(6), pp. 645–655. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70126-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70126-9).

Bocci, G. and Kerbel, R.S. (2016) ‘Pharmacokinetics of metronomic chemotherapy: a neglected but crucial aspect’, *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 13(11), pp. 659–673. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.64>.

Boltjes, A. and van Wijk, F. (2014) ‘Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation’, *Frontiers in Immunology*, 5, p. 131. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00131>.

Bosma, B.M. *et al.* (2008) ‘Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production

in T cells', *Immunology*, 125(1), pp. 91–100. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02824.x>.

Boulland, M.-L. *et al.* (2007) 'Human IL411 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation', *Blood*, 110(1), pp. 220–227. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-036210>.

Brooks, D.G. *et al.* (2006) 'Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo', *Nature Medicine*, 12(11), pp. 1301–1309. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm1492>.

Budiani, D.R., Haryana, S.M. and Sosroseno, W. (2011) 'Interleukin-4 and interferon- γ levels in Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis and nasopharyngeal carcinoma', *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 16(1), pp. 94–97.

Buettner, M. *et al.* (2007) 'Expression of RANTES and MCP-1 in epithelial cells is regulated via LMP1 and CD40', *International Journal of Cancer*, 121(12), pp. 2703–2710. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.23018>.

Burkitt, D. (1958) 'A sarcoma involving the jaws in African children', *The British Journal of Surgery*, 46(197), pp. 218–223. Available at: <https://doi.org/10.1002/bjs.18004619704>.

C, Wu *et al.* (2014) 'Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells', *Immunity*, 41(2). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.011>.

Cahir-McFarland, E.D. *et al.* (2000) 'NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), pp. 6055–6060. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.100119497>.

Cai, T.-T. *et al.* (2017) 'LMP1-mediated glycolysis induces myeloid-derived suppressor cell expansion in nasopharyngeal carcinoma', *PLoS pathogens*, 13(7), p. e1006503. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006503>.

Cai, Y. *et al.* (2014) 'Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3 α and cystatin a predict a poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma', *Medicine*, 93(22), p. e123. Available at: <https://doi.org/10.1097/MD.000000000000123>.

Callan, M.F. *et al.* (2000) 'CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo', *The Journal of Clinical Investigation*, 106(10), pp. 1251–1261. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI10590>.

Cárdenas Sierra, D. *et al.* (2014) 'Age-associated Epstein-Barr virus-specific T cell responses in seropositive healthy adults', *Clinical and Experimental Immunology*, 177(1), pp. 320–332. Available at: <https://doi.org/10.1111/cei.12337>.

Castellano, G. *et al.* (2004) 'Dendritic cells and complement: at the cross road of innate and adaptive immunity', *Molecular Immunology*, 41(2–3), pp. 133–140. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.03.018>.

Caux, C. *et al.* (1992) 'GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells', *Nature*, 360(6401), pp. 258–261. Available at: <https://doi.org/10.1038/360258a0>.

Cayrol, C. and Flemington, E.K. (1995) 'Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor beta igh3 (TGF-beta igh3) and TGF-beta 1', *Journal of Virology*, 69(7), pp. 4206–4212. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.69.7.4206-4212.1995>.

Cerboni, S., Gentili, M. and Manel, N. (2013) 'Diversity of pathogen sensors in dendritic cells', *Advances in Immunology*, 120, pp. 211–237. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417028-5.00008-9>.

Chabot, S. *et al.* (2002) 'Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells', *Glycobiology*, 12(2), pp. 111–118. Available at: <https://doi.org/10.1093/glycob/12.2.111>.

Chang, E.T. *et al.* (2021) 'The Evolving Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 30(6), pp. 1035–1047. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-1702>.

Chang, K.-P. *et al.* (2008) 'Macrophage inflammatory protein-3alpha is a novel serum marker for nasopharyngeal carcinoma detection and prediction of treatment outcomes', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(21), pp. 6979–6987. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0090>.

Chaves, A.C. *et al.* (2001) 'IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of Toxoplasma gondii replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma', *European Journal of Immunology*, 31(2), pp. 333–344. Available at: [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200102\)31:2<333::aid-immu333>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200102)31:2<333::aid-immu333>3.0.co;2-x).

Chen, G. *et al.* (2018) 'Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response', *Nature*, 560(7718), pp. 382–386. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>.

Chen, L. *et al.* (2009) 'Alcohol consumption and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a systematic review', *Nutrition and Cancer*, 61(1), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1080/01635580802372633>.

Chen, L. *et al.* (2017) 'Adjuvant chemotherapy in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: Long-term results of a phase 3 multicentre randomised controlled trial', *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 75, pp. 150–158. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.002>.

Chen, R. *et al.* (2012) 'A human Fab-based immunoconjugate specific for the LMP1 extracellular domain inhibits nasopharyngeal carcinoma growth in vitro and in vivo', *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(3), pp. 594–603. Available at: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0725>.

- Chen, S.-J. *et al.* (2010) ‘Characterization of Epstein-Barr virus miRNAome in nasopharyngeal carcinoma by deep sequencing’, *PloS One*, 5(9), p. e12745. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012745>.
- Chen, T.-C. *et al.* (2017) ‘The immunologic advantage of recurrent nasopharyngeal carcinoma from the viewpoint of Galectin-9/Tim-3-related changes in the tumour microenvironment’, *Scientific Reports*, 7(1), p. 10349. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10386-y>.
- Chen, W. *et al.* (2003) ‘Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3’, *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), pp. 1875–1886. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>.
- Chen, W. (2011) ‘IDO: more than an enzyme’, *Nature Immunology*, 12(9), pp. 809–811. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.2088>.
- Chen, W. and Konkel, J.E. (2010) ‘TGF-beta and “adaptive” Foxp3(+) regulatory T cells’, *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(1), pp. 30–36. Available at: <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp004>.
- Chen, Y., Chew, C.T. and Chan, S.H. (1995) ‘T-cell receptor gene expression in tumour-infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes of patients with nasopharyngeal carcinoma’, *British Journal of Cancer*, 72(1), pp. 117–122. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.1995.286>.
- Chen, Y.-L., Chang, M.-C. and Cheng, W.-F. (2017) ‘Metronomic chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment’, *Cancer Letters*, 400, pp. 282–292. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.01.040>.
- Chen, Y.-P. *et al.* (2019) ‘Nasopharyngeal carcinoma’, *Lancet (London, England)*, 394(10192), pp. 64–80. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30956-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30956-0).
- Chen, Y.-P. *et al.* (2020) ‘Single-cell transcriptomics reveals regulators underlying immune cell diversity and immune subtypes associated with prognosis in nasopharyngeal carcinoma’, *Cell Research*, 30(11), pp. 1024–1042. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0374-x>.
- Cheng, Q. *et al.* (2021) ‘Exosomal microRNA-301a-3p promotes the proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting BTG1 mRNA’, *Molecular Medicine Reports*, 23(5), p. 328. Available at: <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11967>.
- Cheng, S. *et al.* (2021) ‘A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells’, *Cell*, 184(3), pp. 792–809.e23. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.010>.
- Cheng, Z. *et al.* (2021) ‘Tumor-derived Exosomes Induced M2 Macrophage Polarization and Promoted the Metastasis of Osteosarcoma Cells Through Tim-3’, *Archives of Medical Research*, 52(2), pp. 200–210. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.018>.
- Chia, W.-K. *et al.* (2014) ‘Adoptive T-cell transfer and chemotherapy in the first-line treatment of metastatic and/or locally recurrent nasopharyngeal carcinoma’, *Molecular Therapy: The*

Journal of the American Society of Gene Therapy, 22(1), pp. 132–139. Available at: <https://doi.org/10.1038/mt.2013.242>.

Chien, Y.C. *et al.* (2001) ‘Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men’, *The New England Journal of Medicine*, 345(26), pp. 1877–1882. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011610>.

Chijioko, O., Müller, A., *et al.* (2013) ‘Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection’, *Cell Reports*, 5(6), pp. 1489–1498. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.041>.

Chijioko, O., Azzi, T., *et al.* (2013) ‘Innate immune responses against Epstein Barr virus infection’, *Journal of Leukocyte Biology*, 94(6), pp. 1185–1190. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.0313173>.

Chong, P.Y. *et al.* (1988) ‘Tumour infiltrating lymphocytes in nasopharyngeal carcinoma’, *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 17(2), pp. 238–242.

Clarke, P.A. *et al.* (1991) ‘Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 to the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI’, *Nucleic Acids Research*, 19(2), pp. 243–248. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/19.2.243>.

Coghill, A.E. *et al.* (2018) ‘Elevated antibodies against Epstein-Barr virus among individuals predicted to carry nasopharyngeal carcinoma susceptibility variants’, *The Journal of General Virology*, 99(9), pp. 1268–1273. Available at: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001115>.

Cohen, J.I. and Lekstrom, K. (1999) ‘Epstein-Barr virus BARTF1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells’, *Journal of Virology*, 73(9), pp. 7627–7632. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7627-7632.1999>.

Colevas, A.D. *et al.* (2018) ‘NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2018’, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 16(5), pp. 479–490. Available at: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0026>.

Colombo, M. *et al.* (2013) ‘Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles’, *Journal of Cell Science*, 126(Pt 24), pp. 5553–5565. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>.

Colombo, M., Raposo, G. and Théry, C. (2014) ‘Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles’, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, pp. 255–289. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.

Comoli, P. *et al.* (2004) ‘Adoptive transfer of allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells with in vitro antitumor activity boosts LMP2-specific immune response in a patient with EBV-related nasopharyngeal carcinoma’, *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 15(1), pp. 113–117. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh027>.

Comoli, P. *et al.* (2005) 'Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(35), pp. 8942–8949. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.6195>.

Constant, S. *et al.* (1995) 'Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5), pp. 1591–1596. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1591>.

Cook, D.N. *et al.* (2000) 'CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue', *Immunity*, 12(5), pp. 495–503. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80201-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80201-0).

Coomes, S.M. *et al.* (2017) 'CD4⁺ Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation', *Mucosal Immunology*, 10(1), pp. 150–161. Available at: <https://doi.org/10.1038/mi.2016.47>.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A. and Caligiuri, M.A. (2001) 'The biology of human natural killer-cell subsets', *Trends in Immunology*, 22(11), pp. 633–640. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)02060-9).

da Costa, V.G., Marques-Silva, A.C. and Moreli, M.L. (2015) 'The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) 30-bp deletion and XhoI-polymorphism in nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis of observational studies', *Systematic Reviews*, 4, p. 46. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13643-015-0037-z>.

Cui, Q. *et al.* (2016) 'An extended genome-wide association study identifies novel susceptibility loci for nasopharyngeal carcinoma', *Human Molecular Genetics*, 25(16), pp. 3626–3634. Available at: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw200>.

Cui, Q. *et al.* (2017) 'Nasopharyngeal carcinoma risk prediction via salivary detection of host and Epstein-Barr virus genetic variants', *Oncotarget*, 8(56), pp. 95066–95074. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11144>.

D, N. *et al.* (2009) 'Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells', *Cell host & microbe*, 5(4). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.003>.

Daley, D. *et al.* (2017) 'Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance', *Nature Medicine*, 23(5), pp. 556–567. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4314>.

Dawson, C.W., Port, R.J. and Young, L.S. (2012) 'The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC)', *Seminars in Cancer Biology*, 22(2), pp. 144–153. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.004>.

Del Prete, A. *et al.* (2008) 'Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions', *Free Radical Biology & Medicine*, 44(7), pp. 1443–1451. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.037>.

Delbende, C. *et al.* (2009) 'Induction of therapeutic antibodies by vaccination against external loops of tumor-associated viral latent membrane protein', *Journal of Virology*, 83(22), pp. 11734–11745. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00578-09>.

Deluce-Kakwata-Nkor, N. *et al.* (2018) 'Differentiation of human dendritic cell subsets for immune tolerance induction', *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine*, 25(1), pp. 90–95. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2017.08.002>.

Diebold, S.S. (2009) 'Activation of dendritic cells by toll-like receptors and C-type lectins', *Handbook of Experimental Pharmacology*, (188), pp. 3–30. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-71029-5_1.

Dixon, K.O. *et al.* (2021) 'TIM-3 restrains anti-tumour immunity by regulating inflammasome activation', *Nature*, 595(7865), pp. 101–106. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03626-9>.

Dreyfus, D.H. *et al.* (1999) 'Inactivation of NF-kappaB by EBV BZLF-1-encoded ZEBRA protein in human T cells', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(11), pp. 6261–6268.

Drutman, S.B., Kendall, J.C. and Trombetta, E.S. (2012) 'Inflammatory spleen monocytes can upregulate CD11c expression without converting into dendritic cells', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(8), pp. 3603–3610. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102741>.

Du, T. *et al.* (2019) 'Association Between Alcohol Consumption and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma: A Comprehensive Meta-Analysis of Epidemiological Studies', *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 43(11), pp. 2262–2273. Available at: <https://doi.org/10.1111/acer.14184>.

Duan, B. *et al.* (2019) 'Exosomal miR-17-5p promotes angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma via targeting BAMBI', *Journal of Cancer*, 10(26), pp. 6681–6692. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.30757>.

Dudek, A.M. *et al.* (2013) 'Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity', *Frontiers in Immunology*, 4, p. 438. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00438>.

Dukers, D.F. *et al.* (2000) 'Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(2), pp. 663–670. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.663>.

Dzionic, A. *et al.* (2000) 'BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(11), pp. 6037–6046. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6037>.

Dzopalic, T. *et al.* (2012) 'The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors', *Immunologic Research*, 52(1–2), pp. 20–33. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8279-5>.

Eljaafari, A., Li, Y.-P. and Miossec, P. (2009) 'IFN-gamma, as secreted during an alloresponse, induces differentiation of monocytes into tolerogenic dendritic cells, resulting in FoxP3+ regulatory T cell promotion', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(5), pp. 2932–2945. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804352>.

Epstein, A. (2015) 'Why and How Epstein-Barr Virus Was Discovered 50 Years Ago', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 390(Pt 1), pp. 3–15. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_1.

Epstein, M.A. *et al.* (1965) 'MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA', *The Journal of Experimental Medicine*, 121, pp. 761–770. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.121.5.761>.

Everts, B. *et al.* (2014) 'TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation', *Nature Immunology*, 15(4), pp. 323–332. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.2833>.

Everts, B. and Pearce, E.J. (2014) 'Metabolic control of dendritic cell activation and function: recent advances and clinical implications', *Frontiers in Immunology*, 5, p. 203. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00203>.

Fader, C.M. *et al.* (2009) 'TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(12), pp. 1901–1916. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.011>.

Fallarino, F. *et al.* (2002) 'T cell apoptosis by tryptophan catabolism', *Cell Death and Differentiation*, 9(10), pp. 1069–1077. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401073>.

Fang, W. *et al.* (2014) 'EBV-driven LMP1 and IFN- γ up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy', *Oncotarget*, 5(23), pp. 12189–12202. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2608>.

Fang, W. *et al.* (2018) 'Camrelizumab (SHR-1210) alone or in combination with gemcitabine plus cisplatin for nasopharyngeal carcinoma: results from two single-arm, phase 1 trials', *The Lancet. Oncology*, 19(10), pp. 1338–1350. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30495-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30495-9).

Farias, A.S. *et al.* (2013) 'Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE', *CNS neuroscience & therapeutics*, 19(4), pp. 269–277. Available at: <https://doi.org/10.1111/cns.12071>.

Feng, R. *et al.* (2021) 'Intake of Alcohol and Tea and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma: A Population-Based Case-Control Study in Southern China', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 30(3), pp. 545–553. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-1244>.

Ferlay, J. *et al.* (2021) 'Cancer statistics for the year 2020: An overview', *International Journal*

of Cancer, 149(4), pp. 778–789. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.

Ferlay, J. *et al.* (no date) *Global Cancer Observatory: Cancer Today (2020)*, <https://gco.iarc.fr/today/home>. Available at: <http://gco.iarc.fr/today/home> (Accessed: 30 September 2022).

Ferreira, G.B. *et al.* (2011) ‘1,25-Dihydroxyvitamin D3 alters murine dendritic cell behaviour in vitro and in vivo’, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 27(8), pp. 933–941. Available at: <https://doi.org/10.1002/dmrr.1275>.

Feuerer, M. *et al.* (2009) ‘Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes’, *Nature Immunology*, 10(7), pp. 689–695. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.1760>.

Fiola, S. *et al.* (2010) ‘TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(6), pp. 3620–3631. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903736>.

Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1995) ‘Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays’, *Journal of Virology*, 69(5), pp. 2998–3006. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.69.5.2998-3006.1995>.

Fogg, M.H. *et al.* (2009) ‘Decreased EBNA-1-specific CD8+ T cells in patients with Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), pp. 3318–3323. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0813320106>.

Fong, M.Y., McDunn, J. and Kakar, S.S. (2011) ‘Identification of metabolites in the normal ovary and their transformation in primary and metastatic ovarian cancer’, *PloS One*, 6(5), p. e19963. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019963>.

Friberg, J.T. *et al.* (2007) ‘A prospective study of tobacco and alcohol use as risk factors for pharyngeal carcinomas in Singapore Chinese’, *Cancer*, 109(6), pp. 1183–1191. Available at: <https://doi.org/10.1002/cncr.22501>.

Frikha, M. *et al.* (2018) ‘A randomized trial of induction docetaxel-cisplatin-5FU followed by concomitant cisplatin-RT versus concomitant cisplatin-RT in nasopharyngeal carcinoma (GORTEC 2006-02)’, *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(3), pp. 731–736. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx770>.

Fruento, G. *et al.* (2002) ‘Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase’, *The Journal of Experimental Medicine*, 196(4), pp. 459–468. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20020121>.

Fu, M. *et al.* (2019) ‘Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications’, *Molecular Cancer*, 18(1), p. 41. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1001-7>.

Fujita, K. *et al.* (2015) ‘Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via

apoptosis in vitro and in vivo', *International Journal of Oncology*, 46(6), pp. 2419–2430. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2941>.

Gallicchio, L. *et al.* (2006) 'Adulthood consumption of preserved and nonpreserved vegetables and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a systematic review', *International Journal of Cancer*, 119(5), pp. 1125–1135. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.21946>.

Gao, J. *et al.* (2018) 'Expression profiles and clinical value of plasma exosomal Tim-3 and Galectin-9 in non-small cell lung cancer', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(3), pp. 409–415. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.114>.

Gargaro, M. *et al.* (2022) 'Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 activation in mature cDC1 promotes tolerogenic education of inflammatory cDC2 via metabolic communication', *Immunity*, 55(6), pp. 1032–1050.e14. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.05.013>.

Gaudreault, E. *et al.* (2007) 'Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2', *Journal of Virology*, 81(15), pp. 8016–8024. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00403-07>.

Geijtenbeek, T.B. *et al.* (2000) 'Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses', *Cell*, 100(5), pp. 575–585. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80693-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80693-5).

Geissmann, F. *et al.* (2010) 'Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells', *Science (New York, N.Y.)*, 327(5966), pp. 656–661. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1178331>.

van Gent, M. *et al.* (2011) 'EBV lytic-phase protein BGLF5 contributes to TLR9 downregulation during productive infection', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(3), pp. 1694–1702. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903120>.

van Gent, M. *et al.* (2015) 'Silencing the shutoff protein of Epstein-Barr virus in productively infected B cells points to (innate) targets for immune evasion', *The Journal of General Virology*, 96(Pt 4), pp. 858–865. Available at: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000021>.

Gerhard, G.M. *et al.* (2021) 'Tumor-infiltrating dendritic cell states are conserved across solid human cancers', *The Journal of Experimental Medicine*, 218(1), p. e20200264. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20200264>.

Germi, R. *et al.* (2012) 'Three-dimensional structure of the Epstein-Barr virus capsid', *The Journal of General Virology*, 93(Pt 8), pp. 1769–1773. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.043265-0>.

Gires, O. *et al.* (1999) 'Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins', *The EMBO journal*, 18(11), pp. 3064–3073. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3064>.

Glaser, R. *et al.* (2006) 'EBV-encoded dUTPase induces immune dysregulation: Implications for the pathophysiology of EBV-associated disease', *Virology*, 346(1), pp. 205–218. Available

at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.10.034>.

Gleason, M.K. *et al.* (2012) ‘Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9’, *Blood*, 119(13), pp. 3064–3072. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-360321>.

Gong, L. *et al.* (2021) ‘Comprehensive single-cell sequencing reveals the stromal dynamics and tumor-specific characteristics in the microenvironment of nasopharyngeal carcinoma’, *Nature Communications*, 12(1), p. 1540. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21795-z>.

Gordon, J.R. *et al.* (2005) ‘CD8 alpha+, but not CD8 alpha-, dendritic cells tolerize Th2 responses via contact-dependent and -independent mechanisms, and reverse airway hyperresponsiveness, Th2, and eosinophil responses in a mouse model of asthma’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(3), pp. 1516–1522. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1516>.

Gordon, J.R. *et al.* (2014) ‘Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases’, *Frontiers in Immunology*, 5, p. 7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00007>.

Gourzones, C. *et al.* (2010) ‘Extra-cellular release and blood diffusion of BART viral micro-RNAs produced by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells’, *Virology Journal*, 7, p. 271. Available at: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-271>.

Gourzones, C., Barjon, C. and Busson, P. (2012) ‘Host-tumor interactions in nasopharyngeal carcinomas’, *Seminars in Cancer Biology*, 22(2), pp. 127–136. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.002>.

Granier, C. *et al.* (2018) ‘Tim-3 : Biomarqueur et cible thérapeutique en cancérologie’, *M/S. Médecine sciences [ISSN papier : 0767-0974 ; ISSN numérique : 1958-5381]*, , Vol. 34, N° 3; p. 231-237 [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/20183403011>.

Granot, T. *et al.* (2017) ‘Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life’, *Immunity*, 46(3), pp. 504–515. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.019>.

Gregori, S. *et al.* (2010) ‘Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway’, *Blood*, 116(6), pp. 935–944. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-234872>.

Groth, C. *et al.* (2019) ‘Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression’, *British Journal of Cancer*, 120(1), pp. 16–25. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0333-1>.

Guak, H. *et al.* (2018) ‘Glycolytic metabolism is essential for CCR7 oligomerization and dendritic cell migration’, *Nature Communications*, 9(1), p. 2463. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04804-6>.

Guilliams, M. *et al.* (2014) ‘Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny’, *Nature Reviews. Immunology*, 14(8), pp. 571–578. Available

at: <https://doi.org/10.1038/nri3712>.

Guo, C. *et al.* (2020) 'Exosomal Noncoding RNAs and Tumor Drug Resistance', *Cancer Research*, 80(20), pp. 4307–4313. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0032>.

Guo, H. *et al.* (2019) 'Knockdown of Notch1 inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth and metastasis via downregulation of CCL2, CXCL16, and uPA', *Molecular Carcinogenesis*, 58(10), pp. 1886–1896. Available at: <https://doi.org/10.1002/mc.23082>.

Gurer, C. *et al.* (2008) 'Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses', *Blood*, 112(4), pp. 1231–1239. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-148072>.

Gutsch, D.E. *et al.* (1994) 'The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kappa B', *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), pp. 1939–1948. Available at: <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1939-1948.1994>.

H, zur H. *et al.* (1970) 'EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx', *Nature*, 228(5276). Available at: <https://doi.org/10.1038/2281056a0>.

Haase, C., Jørgensen, T.N. and Michelsen, B.K. (2002) 'Both exogenous and endogenous interleukin-10 affects the maturation of bone-marrow-derived dendritic cells in vitro and strongly influences T-cell priming in vivo', *Immunology*, 107(4), pp. 489–499. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01529.x>.

Hackstein, H. *et al.* (2003) 'Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo', *Blood*, 101(11), pp. 4457–4463. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3370>.

Hahn, A.M. *et al.* (2005) 'Interferon regulatory factor 7 is negatively regulated by the Epstein-Barr virus immediate-early gene, BZLF-1', *Journal of Virology*, 79(15), pp. 10040–10052. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.10040-10052.2005>.

Hamanishi, J. *et al.* (2016) 'PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues', *International Journal of Clinical Oncology*, 21(3), pp. 462–473. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10147-016-0959-z>.

Hanahan, D. (2022) 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions', *Cancer Discovery*, 12(1), pp. 31–46. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

Haneklaus, M. *et al.* (2012) 'Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(8), pp. 3795–3799. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200312>.

Haniffa, M. *et al.* (2012) 'Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells', *Immunity*, 37(1), pp. 60–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.012>.

Haniffa, M., Collin, M. and Ginhoux, F. (2013) 'Ontogeny and functional specialization of

dendritic cells in human and mouse’, *Advances in Immunology*, 120, pp. 1–49. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417028-5.00001-6>.

Hao, Q. *et al.* (2022) ‘Tumor-Derived Exosomes in Tumor-Induced Immune Suppression’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), p. 1461. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23031461>.

Harada, Yohsuke *et al.* (2010) ‘Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells’, *The Journal of Experimental Medicine*, 207(7), pp. 1381–1391. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20100004>.

Haraguchi, S., Good, R.A. and Day, N.K. (1995) ‘Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns’, *Immunology Today*, 16(12), pp. 595–603. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80083-2](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80083-2).

Harmati, M. *et al.* (2017) ‘Stressors alter intercellular communication and exosome profile of nasopharyngeal carcinoma cells’, *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 46(4), pp. 259–266. Available at: <https://doi.org/10.1111/jop.12486>.

Hatton, O. *et al.* (2016) ‘NKG2A-Expressing Natural Killer Cells Dominate the Response to Autologous Lymphoblastoid Cells Infected with Epstein-Barr Virus’, *Frontiers in Immunology*, 7, p. 607. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00607>.

Hc, F. *et al.* (2018) ‘Increased risk of incident nasopharyngeal carcinoma with exposure to air pollution’, *PloS one*, 13(9). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204568>.

Hemmi, H. and Akira, S. (2005) ‘TLR signalling and the function of dendritic cells’, *Chemical Immunology and Allergy*, 86, pp. 120–135. Available at: <https://doi.org/10.1159/000086657>.

Henderson, E.E., Fronko, G. and Franks, C. (1991) ‘EBV Genome Organization in Lymphoblastoid Cell Lines Established Following Enhancement With Aflatoxin B1 and Relevance to Nasopharyngeal Carcinoma’, in D.V. Ablashi *et al.* (eds) *Epstein-Barr Virus and Human Disease · 1990*. Totowa, NJ: Humana Press (Experimental Biology and Medicine), pp. 391–405. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0405-3_56.

Henle, G. *et al.* (1979) ‘Rheumatoid factor as a cause of positive reactions in tests for Epstein-Barr virus-specific IgM antibodies’, *Clinical and Experimental Immunology*, 36(3), pp. 415–422.

Herait, P. *et al.* (1987) ‘Lymphocyte subsets in tumour of patients with undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: presence of lymphocytes with the phenotype of activated T cells’, *British Journal of Cancer*, 55(2), pp. 135–139. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.28>.

Hinshaw, D.C. and Shevde, L.A. (2019) ‘The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression’, *Cancer Research*, 79(18), pp. 4557–4566. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>.

Hirai, N. *et al.* (2016) 'Potential Interest in Circulating miR-BART17-5p As a Post-Treatment Biomarker for Prediction of Recurrence in Epstein-Barr Virus-Related Nasopharyngeal Carcinoma', *PloS One*, 11(9), p. e0163609. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163609>.

Hislop, A.D. *et al.* (2005) 'Tonsillar homing of Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cells and the virus-host balance', *The Journal of Clinical Investigation*, 115(9), pp. 2546–2555. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI24810>.

Hislop, A.D., Ressing, M.E., *et al.* (2007) 'A CD8+ T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates', *The Journal of Experimental Medicine*, 204(8), pp. 1863–1873. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20070256>.

Hislop, A.D., Taylor, G.S., *et al.* (2007) 'Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus', *Annual Review of Immunology*, 25, pp. 587–617. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141553>.

Hjalgrim, H. *et al.* (2003) 'Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis', *The New England Journal of Medicine*, 349(14), pp. 1324–1332. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa023141>.

Hochberg, D. *et al.* (2004) 'Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), pp. 239–244. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2237267100>.

Hong, B.S. *et al.* (2009) 'Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells', *BMC genomics*, 10, p. 556. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-556>.

Hooykaas, M.J.G. *et al.* (2017) 'EBV MicroRNA BART16 Suppresses Type I IFN Signaling', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 198(10), pp. 4062–4073. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501605>.

Hopkins, R. *et al.* (2021) 'Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Underpin Resistance to Adoptive T Cell Therapy in Nasopharyngeal Carcinoma', *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 29(2), pp. 734–743. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.040>.

Hørding, U. *et al.* (1994) 'Human papillomavirus types 11 and 16 detected in nasopharyngeal carcinomas by the polymerase chain reaction', *The Laryngoscope*, 104(1 Pt 1), pp. 99–102. Available at: <https://doi.org/10.1288/00005537-199401000-00018>.

Horikawa, T. *et al.* (2000) 'Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma', *Cancer*, 89(4), pp. 715–723. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20000815\)89:4<715::aid-cncr1>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20000815)89:4<715::aid-cncr1>3.0.co;2-9).

Horst, D. *et al.* (2009) 'Specific targeting of the EBV lytic phase protein BNLF2a to the transporter associated with antigen processing results in impairment of HLA class I-restricted

antigen presentation', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(4), pp. 2313–2324. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803218>.

Hsu, C. *et al.* (2010) 'Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C', *The Journal of Cell Biology*, 189(2), pp. 223–232. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>.

Hsu, M.-C. *et al.* (2010) 'Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma', *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23(10), pp. 1393–1403. Available at: <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.130>.

Hsu, W.-L. *et al.* (2020) 'Cigarette smoking increases the risk of nasopharyngeal carcinoma through the elevated level of IgA antibody against Epstein-Barr virus capsid antigen: A mediation analysis', *Cancer Medicine*, 9(5), pp. 1867–1876. Available at: <https://doi.org/10.1002/cam4.2832>.

Hu, C. *et al.* (2018) 'Exosome-related tumor microenvironment', *Journal of Cancer*, 9(17), pp. 3084–3092. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.26422>.

Hu, J. *et al.* (2018) 'Salvage treatment using carbon ion radiation in patients with locoregionally recurrent nasopharyngeal carcinoma: Initial results', *Cancer*, 124(11), pp. 2427–2437. Available at: <https://doi.org/10.1002/cncr.31318>.

Hu, T. *et al.* (2019) 'Smoking can increase nasopharyngeal carcinoma risk by repeatedly reactivating Epstein-Barr Virus: An analysis of a prospective study in southern China', *Cancer Medicine*, 8(5), pp. 2561–2571. Available at: <https://doi.org/10.1002/cam4.2083>.

Huang, D. *et al.* (2017) 'MiR-20a-5p promotes radio-resistance by targeting Rab27B in nasopharyngeal cancer cells', *Cancer Cell International*, 17, p. 32. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0389-7>.

Huang, H. *et al.* (2010) 'Tolerogenic dendritic cells induce CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cell differentiation from CD4⁺CD25⁻/loFoxp3⁻ effector T cells', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(9), pp. 5003–5010. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903446>.

Huang, H.-C. *et al.* (2020) 'Association between coarse particulate matter (PM10-2.5) and nasopharyngeal carcinoma among Taiwanese men', *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 68(2), pp. 419–424. Available at: <https://doi.org/10.1136/jim-2019-001119>.

Huang, J. *et al.* (2016) 'Serum metabolomic profiling of prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial', *British Journal of Cancer*, 115(9), pp. 1087–1095. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.305>.

Huang, J. *et al.* (2017) 'Epstein-Barr virus-specific adoptive immunotherapy for recurrent, metastatic nasopharyngeal carcinoma', *Cancer*, 123(14), pp. 2642–2650. Available at: <https://doi.org/10.1002/cncr.30541>.

Huang, P.-Y. *et al.* (2016) ‘Tumor CTLA-4 overexpression predicts poor survival in patients with nasopharyngeal carcinoma’, *Oncotarget*, 7(11), pp. 13060–13068. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7421>.

Huang, W.-T. and Lin, C.-W. (2014) ‘EBV-encoded miR-BART20-5p and miR-BART8 inhibit the IFN- γ -STAT1 pathway associated with disease progression in nasal NK-cell lymphoma’, *The American Journal of Pathology*, 184(4), pp. 1185–1197. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.12.024>.

Huang, Y.-F. *et al.* (2019) ‘Comparative Safety of PD-1/PD-L1 Inhibitors for Cancer Patients: Systematic Review and Network Meta-Analysis’, *Frontiers in Oncology*, 9, p. 972. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00972>.

Huang, Y.-S. *et al.* (2020) ‘IDO and Kynurenine Metabolites in Peripheral and CNS Disorders’, *Frontiers in Immunology*, 11, p. 388. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00388>.

Hui, E.P. *et al.* (2013) ‘Phase I trial of recombinant modified vaccinia ankara encoding Epstein-Barr viral tumor antigens in nasopharyngeal carcinoma patients’, *Cancer Research*, 73(6), pp. 1676–1688. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2448>.

Humans, I.W.G. on the E. of C.R. to (1993) *Some Naturally Occurring Substances*. International Agency for Research on Cancer.

Huo, S. *et al.* (2020) ‘EBV-EBNA1 constructs an immunosuppressive microenvironment for nasopharyngeal carcinoma by promoting the chemoattraction of Treg cells’, *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2), p. e001588. Available at: <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001588>.

Hwu, P. *et al.* (2000) ‘Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(7), pp. 3596–3599. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3596>.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2012) ‘Personal habits and indoor combustions’, *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100(Pt E), pp. 1–538.

Iero, M. *et al.* (2008) ‘Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity’, *Cell Death and Differentiation*, 15(1), pp. 80–88. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402237>.

Ishikawa, F. *et al.* (2007) ‘The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways’, *Blood*, 110(10), pp. 3591–3660. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-071613>.

Iwakiri, D. *et al.* (2009) ‘Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3’, *The Journal of Experimental Medicine*, 206(10), pp. 2091–2099. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20081761>.

Iwakiri, D. (2016) ‘Multifunctional non-coding Epstein-Barr virus encoded RNAs (EBERs) contribute to viral pathogenesis’, *Virus Research*, 212, pp. 30–38. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.007>.

Iwakiri, D., Samanta, M. and Takada, K. (2006) '[Mechanisms of EBV-mediated oncogenesis]', *Uirusu*, 56(2), pp. 201–208. Available at: <https://doi.org/10.2222/jsv.56.201>.

Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004) 'Toll-like receptor control of the adaptive immune responses', *Nature Immunology*, 5(10), pp. 987–995. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni1112>.

Izumi, K.M. and Kieff, E.D. (1997) 'The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), pp. 12592–12597. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12592>.

J, L. *et al.* (2021) 'Exosomal transfer of miR-106a-5p contributes to cisplatin resistance and tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma', *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(19). Available at: <https://doi.org/10.1111/jcmm.16801>.

Jain, A., Chia, W.K. and Toh, H.C. (2016) 'Immunotherapy for nasopharyngeal cancer-a review', *Chinese Clinical Oncology*, 5(2), p. 22. Available at: <https://doi.org/10.21037/cco.2016.03.08>.

Jang, S.C. *et al.* (2013) 'Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors', *ACS nano*, 7(9), pp. 7698–7710. Available at: <https://doi.org/10.1021/nn402232g>.

Jantsch, J. *et al.* (2008) 'Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(7), pp. 4697–4705. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4697>.

Jenkins, S.J. *et al.* (2007) 'Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(6), pp. 3515–3523. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3515>.

Jia, J. *et al.* (2019) 'Galectins control MTOR and AMPK in response to lysosomal damage to induce autophagy', *Autophagy*, 15(1), pp. 169–171. Available at: <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1505155>.

Jiang, Y. *et al.* (2019) 'PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(5), pp. 1111–1122. Available at: <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1571892>.

Jiang, Y., Li, Y. and Zhu, B. (2015) 'T-cell exhaustion in the tumor microenvironment', *Cell Death & Disease*, 6, p. e1792. Available at: <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.162>.

Jikuya, R. *et al.* (2020) 'Galectin-9 expression as a poor prognostic factor in patients with renal cell carcinoma', *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 69(10), pp. 2041–2051. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02608-6>.

Jin, S. *et al.* (2020) ‘Single-cell transcriptomic analysis defines the interplay between tumor cells, viral infection, and the microenvironment in nasopharyngeal carcinoma’, *Cell Research*, 30(11), pp. 950–965. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00402-8>.

John, S. and Mishra, R. (2016) ‘Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics’, *Journal of Biosciences*, 41(3), pp. 507–534. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9616-y>.

Johnstone, R.M. *et al.* (1987) ‘Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)’, *The Journal of Biological Chemistry*, 262(19), pp. 9412–9420.

Jud, A. *et al.* (2017) ‘Tonsillar CD56brightNKG2A+ NK cells restrict primary Epstein-Barr virus infection in B cells via IFN- γ ’, *Oncotarget*, 8(4), pp. 6130–6141. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14045>.

Jung, K.O. *et al.* (2017) ‘Visualization of exosome-mediated miR-210 transfer from hypoxic tumor cells’, *Oncotarget*, 8(6), pp. 9899–9910. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14247>.

Kadomoto, S., Izumi, K. and Mizokami, A. (2020) ‘The CCL20-CCR6 Axis in Cancer Progression’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), p. 5186. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21155186>.

Kadowaki, N. (2007) ‘Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation’, *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 56(3), pp. 193–199. Available at: <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-07-146>.

Kamara, S. *et al.* (2021) ‘Novel EBV LMP1 C-terminal domain binding affibody molecules as potential agents for in vivo molecular imaging diagnosis of nasopharyngeal carcinoma’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(19), pp. 7283–7293. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11559-6>.

Kanamori, M. *et al.* (2016) ‘Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications’, *Trends in Immunology*, 37(11), pp. 803–811. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.012>.

Kareva, I. and Hahnfeldt, P. (2013) ‘The emerging “hallmarks” of metabolic reprogramming and immune evasion: distinct or linked?’, *Cancer Research*, 73(9), pp. 2737–2742. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3696>.

Karimzadeh, M.R. *et al.* (2020) ‘Exosomal Long Noncoding RNAs: Insights into Emerging Diagnostic and Therapeutic Applications in Lung Cancer’, *Journal of Oncology*, 2020, p. 7630197. Available at: <https://doi.org/10.1155/2020/7630197>.

Kelly, B. and O’Neill, L.A.J. (2015) ‘Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity’, *Cell Research*, 25(7), pp. 771–784. Available at: <https://doi.org/10.1038/cr.2015.68>.

Keryer-Bibens, C. *et al.* (2006) ‘Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal

carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9', *BMC cancer*, 6, p. 283. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-283>.

Khanna, R., Burrows, S.R. and Moss, D.J. (1995) 'Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases', *Microbiological Reviews*, 59(3), pp. 387–405. Available at: <https://doi.org/10.1128/mr.59.3.387-405.1995>.

Kim, J. and Bae, J.-S. (2016) 'Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment', *Mediators of Inflammation*, 2016, p. 6058147. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/6058147>.

Kim, Y.-S. *et al.* (2018) 'The potential theragnostic (diagnostic+therapeutic) application of exosomes in diverse biomedical fields', *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 22(2), pp. 113–125. Available at: <https://doi.org/10.4196/kjpp.2018.22.2.113>.

Kis, L.L. *et al.* (2011) 'STAT6 signaling pathway activated by the cytokines IL-4 and IL-13 induces expression of the Epstein-Barr virus-encoded protein LMP-1 in absence of EBNA-2: implications for the type II EBV latent gene expression in Hodgkin lymphoma', *Blood*, 117(1), pp. 165–174. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-265272>.

Klibi, J. *et al.* (2009) 'Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells', *Blood*, 113(9), pp. 1957–1966. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-142596>.

Kobayashi, M. *et al.* (1998) 'A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(12), pp. 5869–5873.

Kong, L. *et al.* (2016) 'Phase I/II trial evaluating concurrent carbon-ion radiotherapy plus chemotherapy for salvage treatment of locally recurrent nasopharyngeal carcinoma', *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), p. 101. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0164-5>.

Krawczyk, C.M. *et al.* (2010) 'Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation', *Blood*, 115(23), pp. 4742–4749. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-249540>.

Kumar, V. *et al.* (2016) 'The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment', *Trends in Immunology*, 37(3), pp. 208–220. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>.

Kurth, J. *et al.* (2000) 'EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency', *Immunity*, 13(4), pp. 485–495. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00048-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00048-0).

Kurts, C. *et al.* (1997) 'Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 186(2), pp. 239–245. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.186.2.239>.

Kvedaraitė, E. and Ginhoux, F. (2022) 'Human dendritic cells in cancer', *Science Immunology*,

7(70), p. eabm9409. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abm9409>.

Kwok-Wai, L., Grace Tin-Yun, C. and Ka-Fai, T. (2012) 'Deciphering the molecular genetic basis of NPC through molecular, cytogenetic, and epigenetic approaches', *Seminars in cancer biology*, 22(2). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.011>.

Lai, F.M. *et al.* (1990) 'Immunohistological characteristics of the infiltrating lymphoid cells and expression of HLA class I and II antigens in nasopharyngeal carcinoma', *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, 417(4), pp. 347–352. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01605787>.

Lambert, S.L. and Martinez, O.M. (2007) 'Latent membrane protein 1 of EBV activates phosphatidylinositol 3-kinase to induce production of IL-10', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(12), pp. 8225–8234. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8225>.

Lan, B. *et al.* (2019) 'The Role of Exosomes in Pancreatic Cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), p. E4332. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20184332>.

Lang, H.-L. *et al.* (2017) 'Glioma cells promote angiogenesis through the release of exosomes containing long non-coding RNA POU3F3', *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(5), pp. 959–972.

Laplante, M. and Sabatini, D.M. (2012) 'mTOR signaling in growth control and disease', *Cell*, 149(2), pp. 274–293. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.

Lau, K.-M. *et al.* (2007) 'Increase in circulating Foxp3+CD4+CD25(high) regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients', *British Journal of Cancer*, 96(4), pp. 617–622. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603580>.

Lavin, Y. *et al.* (2017) 'Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses', *Cell*, 169(4), pp. 750–765.e17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.014>.

Le Naour, F. *et al.* (2001) 'Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), pp. 17920–17931. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M100156200>.

Leal Rojas, I.M. *et al.* (2017) 'Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Promote Th1 and Th17 Effector Function in Memory CD4+ T Cells', *Frontiers in Immunology*, 8, p. 971. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00971>.

Lee, J. *et al.* (2015) 'Clonal analysis of human dendritic cell progenitor using a stromal cell culture', *Journal of Immunological Methods*, 425, pp. 21–26. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.06.004>.

Leen, A. *et al.* (2001) 'Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses', *Journal of Virology*, 75(18), pp. 8649–8659. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.75.18.8649-8659.2001>.

- Lehtonen, A. *et al.* (2005) 'Differential expression of IFN regulatory factor 4 gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(10), pp. 6570–6579. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6570>.
- Lerner, M.R. *et al.* (1981) 'Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(2), pp. 805–809. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.2.805>.
- Leung, C.S. *et al.* (2013) 'Robust T-cell stimulation by Epstein-Barr virus-transformed B cells after antigen targeting to DEC-205', *Blood*, 121(9), pp. 1584–1594. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-450775>.
- Levine, P.H. *et al.* (1971) 'Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease', *Cancer*, 27(2), pp. 416–421. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197102\)27:2<416::aid-cnrcr2820270227>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197102)27:2<416::aid-cnrcr2820270227>3.0.co;2-w).
- Levitskaya, J. *et al.* (1995) 'Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1', *Nature*, 375(6533), pp. 685–688. Available at: <https://doi.org/10.1038/375685a0>.
- Lewis, G.D. *et al.* (2016) 'Intensity-modulated proton therapy for nasopharyngeal carcinoma: Decreased radiation dose to normal structures and encouraging clinical outcomes', *Head & Neck*, 38 Suppl 1, pp. E1886–1895. Available at: <https://doi.org/10.1002/hed.24341>.
- Li, F. *et al.* (2005) 'Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis', *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), pp. 6225–6234. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6225-6234.2005>.
- Li, H. *et al.* (2017) 'Exosomes secreted from mutant-HIF-1 α -modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit', *Cell Biology International*, 41(12), pp. 1379–1390. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbin.10869>.
- Li, M. *et al.* (2018) 'Horizontal transfer of exosomal CXCR4 promotes murine hepatocarcinoma cell migration, invasion and lymphangiogenesis', *Gene*, 676, pp. 101–109. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.018>.
- Li, W.-F. *et al.* (2019) 'Concurrent chemoradiotherapy with/without induction chemotherapy in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: Long-term results of phase 3 randomized controlled trial', *International Journal of Cancer*, 145(1), pp. 295–305. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.32099>.
- Li, X. *et al.* (2010) 'Induction of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated regulatory dendritic cells', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(2), pp. 190–199. Available at: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0023OC>.
- Li, Z. *et al.* (2008) 'Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis', *Cancer Research*, 68(21), pp. 8687–8694. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0449>.

- Li, Z.-L. *et al.* (2015) 'COX-2 promotes metastasis in nasopharyngeal carcinoma by mediating interactions between cancer cells and myeloid-derived suppressor cells', *Oncoimmunology*, 4(11), p. e1044712. Available at: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1044712>.
- Liang, B. *et al.* (2008) 'Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(9), pp. 5916–5926. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5916>.
- Liang, Y. *et al.* (2021) 'Engineering exosomes for targeted drug delivery', *Theranostics*, 11(7), pp. 3183–3195. Available at: <https://doi.org/10.7150/thno.52570>.
- Lim, W.H. *et al.* (2007) 'Human plasmacytoid dendritic cells regulate immune responses to Epstein-Barr virus (EBV) infection and delay EBV-related mortality in humanized NOD-SCID mice', *Blood*, 109(3), pp. 1043–1050. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-024802>.
- Lin, D.-C. *et al.* (2014) 'The genomic landscape of nasopharyngeal carcinoma', *Nature Genetics*, 46(8), pp. 866–871. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.3006>.
- Lin, T.-C. *et al.* (2013) 'Epstein-Barr virus-encoded miR-BART20-5p inhibits T-bet translation with secondary suppression of p53 in invasive nasal NK/T-cell lymphoma', *The American Journal of Pathology*, 182(5), pp. 1865–1875. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.025>.
- Lin, Z. *et al.* (2014) 'Human papillomavirus 16 detected in nasopharyngeal carcinomas in white Americans but not in endemic Southern Chinese patients', *Head & Neck*, 36(5), pp. 709–714. Available at: <https://doi.org/10.1002/hed.23362>.
- Linton, R.E. *et al.* (2021) 'Nasopharyngeal carcinoma among the Bidayuh of Sarawak, Malaysia: History and risk factors', *Oncology Letters*, 22(1), p. 514. Available at: <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12775>.
- Liou, A.K.-F. *et al.* (2020) 'Elevated IL18 levels in Nasopharyngeal carcinoma induced PD-1 expression on NK cells in TILs leading to poor prognosis', *Oral Oncology*, 104, p. 104616. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104616>.
- Liu, J. *et al.* (2017) 'Salvage endoscopic nasopharyngectomy for local recurrent or residual nasopharyngeal carcinoma: a 10-year experience', *International Journal of Clinical Oncology*, 22(5), pp. 834–842. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1143-9>.
- Liu, L. *et al.* (2019) 'Exosomal cyclophilin A as a novel noninvasive biomarker for Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma', *Cancer Medicine*, 8(6), pp. 3142–3151. Available at: <https://doi.org/10.1002/cam4.2185>.
- Liu, Y. *et al.* (2021) 'Tumour heterogeneity and intercellular networks of nasopharyngeal carcinoma at single cell resolution', *Nature Communications*, 12(1), p. 741. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21043-4>.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods (San Diego, Calif.)*,

25(4), pp. 402–408. Available at: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Lo, A.K.-F. *et al.* (2021) ‘The Role of EBV-Encoded LMP1 in the NPC Tumor Microenvironment: From Function to Therapy’, *Frontiers in Oncology*, 11, p. 640207. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.640207>.

Lo, Y.-L. *et al.* (2016) ‘Partial Least Square Discriminant Analysis Discovered a Dietary Pattern Inversely Associated with Nasopharyngeal Carcinoma Risk’, *PloS One*, 11(6), p. e0155892. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155892>.

Locasale, J.W. *et al.* (2012) ‘Metabolomics of human cerebrospinal fluid identifies signatures of malignant glioma’, *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 11(6), p. M111.014688. Available at: <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014688>.

Long, H.M. *et al.* (2005) ‘CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines’, *Journal of Virology*, 79(8), pp. 4896–4907. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.8.4896-4907.2005>.

Long, H.M. *et al.* (2011) ‘Cytotoxic CD4+ T cell responses to EBV contrast with CD8 responses in breadth of lytic cycle antigen choice and in lytic cycle recognition’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(1), pp. 92–101. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100590>.

Long, H.M. *et al.* (2013) ‘MHC II tetramers visualize human CD4+ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response’, *The Journal of Experimental Medicine*, 210(5), pp. 933–949. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20121437>.

Long, M. *et al.* (2017) ‘Cigarette smoking and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis of epidemiological studies’, *BMJ open*, 7(10), p. e016582. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016582>.

Lu, M. *et al.* (2011) ‘Therapeutic induction of tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells in a mouse model of house dust mite-asthma’, *Allergy*, 66(5), pp. 612–620. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02526.x>.

Lu, T. *et al.* (2020) ‘Circulating Epstein-Barr virus microRNAs BART7-3p and BART13-3p as novel biomarkers in nasopharyngeal carcinoma’, *Cancer Science*, 111(5), pp. 1711–1723. Available at: <https://doi.org/10.1111/cas.14381>.

Lu, Y. *et al.* (2017) ‘Epstein-Barr Virus miR-BART6-3p Inhibits the RIG-I Pathway’, *Journal of Innate Immunity*, 9(6), pp. 574–586. Available at: <https://doi.org/10.1159/000479749>.

Lünemann, A., Rowe, M. and Nadal, D. (2015) ‘Innate Immune Recognition of EBV’, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 391, pp. 265–287. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_9.

Luo, Y. *et al.* (2020) ‘Diagnostic value of exosomal circMYC in radioresistant nasopharyngeal carcinoma’, *Head & Neck*, 42(12), pp. 3702–3711. Available at:

<https://doi.org/10.1002/hed.26441>.

Lutzky, V.P. *et al.* (2014) ‘Cytotoxic T cell adoptive immunotherapy as a treatment for nasopharyngeal carcinoma’, *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 21(2), pp. 256–259. Available at: <https://doi.org/10.1128/CVI.00121-13>.

Lv, J.-W. *et al.* (2019) ‘Comparative safety and efficacy of anti-PD-1 monotherapy, chemotherapy alone, and their combination therapy in advanced nasopharyngeal carcinoma: findings from recent advances in landmark trials’, *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 7(1), p. 159. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0636-7>.

Lv, K. *et al.* (2011) ‘Galectin-9 administration ameliorates CVB3 induced myocarditis by promoting the proliferation of regulatory T cells and alternatively activated Th2 cells’, *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 140(1), pp. 92–101. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.03.017>.

Lv, R., Bao, Q. and Li, Y. (2017) ‘Regulation of M1-type and M2-type macrophage polarization in RAW264.7 cells by Galectin-9’, *Molecular Medicine Reports*, 16(6), pp. 9111–9119. Available at: <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7719>.

Lyu, X. *et al.* (2018) ‘EBV-miR-BART1-5P activates AMPK/mTOR/HIF1 pathway via a PTEN independent manner to promote glycolysis and angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma’, *PLoS pathogens*, 14(12), p. e1007484. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007484>.

MacIver, N.J., Michalek, R.D. and Rathmell, J.C. (2013) ‘Metabolic regulation of T lymphocytes’, *Annual Review of Immunology*, 31, pp. 259–283. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>.

Mahale, P. *et al.* (2016) ‘Association Between Hepatitis C Virus and Head and Neck Cancers’, *Journal of the National Cancer Institute*, 108(8). Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djw035>.

Maier, B. *et al.* (2020) ‘A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity’, *Nature*, 580(7802), pp. 257–262. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2134-y>.

Malinarich, F. *et al.* (2015) ‘High mitochondrial respiration and glycolytic capacity represent a metabolic phenotype of human tolerogenic dendritic cells’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 194(11), pp. 5174–5186. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303316>.

Mannavola, F. *et al.* (2019) ‘Revisiting the Role of Exosomes in Colorectal Cancer: Where Are We Now?’, *Frontiers in Oncology*, 9, p. 521. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00521>.

Mao, Y.-P. *et al.* (2016) ‘Prognostic factors and failure patterns in non-metastatic nasopharyngeal carcinoma after intensity-modulated radiotherapy’, *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), p. 103. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0167-2>.

Matsui, T. *et al.* (2009) ‘CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*,

182(11), pp. 6815–6823. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802008>.

Matsumoto, R. *et al.* (1998) ‘Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes’, *The Journal of Biological Chemistry*, 273(27), pp. 16976–16984. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16976>.

Matsuzaki, J. *et al.* (2006) ‘1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 downmodulates the functional differentiation of Th1 cytokine-conditioned bone marrow-derived dendritic cells beneficial for cytotoxic T lymphocyte generation’, *Cancer Science*, 97(2), pp. 139–147. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00144.x>.

Mautner, J. and Bornkamm, G.W. (2012) ‘The role of virus-specific CD4⁺ T cells in the control of Epstein-Barr virus infection’, *European Journal of Cell Biology*, 91(1), pp. 31–35. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.01.007>.

Mei, Y.-P. *et al.* (2007) ‘Silencing of LMP1 induces cell cycle arrest and enhances chemosensitivity through inhibition of AKT signaling pathway in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cells’, *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(11), pp. 1379–1385. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.6.11.4274>.

Meij, P. *et al.* (1999) ‘Restricted low-level human antibody responses against Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 in a subgroup of patients with EBV-associated diseases’, *The Journal of Infectious Diseases*, 179(5), pp. 1108–1115. Available at: <https://doi.org/10.1086/314704>.

Merad, M. *et al.* (2013) ‘The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting’, *Annual Review of Immunology*, 31, pp. 563–604. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>.

Michaud, F. *et al.* (2010) ‘Epstein-Barr virus interferes with the amplification of IFN α secretion by activating suppressor of cytokine signaling 3 in primary human monocytes’, *PloS One*, 5(7), p. e11908. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011908>.

Middeldorp, J.M. and Pegtel, D.M. (2008) ‘Multiple roles of LMP1 in Epstein-Barr virus induced immune escape’, *Seminars in Cancer Biology*, 18(6), pp. 388–396. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.10.004>.

Mildner, A. and Jung, S. (2014) ‘Development and function of dendritic cell subsets’, *Immunity*, 40(5), pp. 642–656. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016>.

Miller, G. *et al.* (2007) ‘Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses’, *Advances in Cancer Research*, 97, pp. 81–109. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(06\)97004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(06)97004-3).

Ming, W. *et al.* (2020) ‘Exosomal LGALS9 in the cerebrospinal fluid of glioblastoma patients suppressed dendritic cell antigen presentation and cytotoxic T-cell immunity’, *Cell death & disease*, 11(10). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03042-3>.

de Mingo Pulido, Á. *et al.* (2018) ‘TIM-3 Regulates CD103⁺ Dendritic Cell Function and Response to Chemotherapy in Breast Cancer’, *Cancer Cell*, 33(1), pp. 60-74.e6. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.019>.

Mittelbrunn, M. and Sánchez-Madrid, F. (2012) 'Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(5), pp. 328–335. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3335>.

Miyawaki, T. *et al.* (1991) 'Expression of CD45R0 (UCHL1) by CD4+ and CD8+ T cells as a sign of in vivo activation in infectious mononucleosis', *Clinical and Experimental Immunology*, 83(3), pp. 447–451. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1991.tb05659.x>.

Molinier-Frenkel, V., Prévost-Blondel, A. and Castellano, F. (2019) 'The IL4I1 Enzyme: A New Player in the Immunosuppressive Tumor Microenvironment', *Cells*, 8(7), p. E757. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8070757>.

Moralès, O. *et al.* (2012) 'EBV Latency II-derived peptides induce a specific CD4+ cytotoxic T-cell activity and not a CD4+ regulatory T-cell response', *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 35(3), pp. 254–266. Available at: <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31824d72c5>.

Moretto, M.M., Lawlor, E.M. and Khan, I.A. (2010) 'Lack of interleukin-12 in p40-deficient mice leads to poor CD8+ T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection', *Infection and Immunity*, 78(6), pp. 2505–2511. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00753-09>.

Morishita, A. *et al.* (2021) 'Galectin-9 suppresses the tumor growth of colon cancer in vitro and in vivo', *Oncology Reports*, 45(6), p. 105. Available at: <https://doi.org/10.3892/or.2021.8056>.

Morrison, T.E. and Kenney, S.C. (2004) 'BZLF1, an Epstein-Barr virus immediate-early protein, induces p65 nuclear translocation while inhibiting p65 transcriptional function', *Virology*, 328(2), pp. 219–232. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.020>.

Mrizak, D. *et al.* (2015) 'Effect of nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes on human regulatory T cells', *Journal of the National Cancer Institute*, 107(1), p. 363. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/dju363>.

Mulcahy, L.A., Pink, R.C. and Carter, D.R.F. (2014) 'Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake', *Journal of Extracellular Vesicles*, 3. Available at: <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>.

Müller, N. *et al.* (2013) 'Glucocorticoids induce effector T cell depolarization via ERM proteins, thereby impeding migration and APC conjugation', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(8), pp. 4360–4370. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201520>.

Münz, C. *et al.* (2000) 'Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1', *The Journal of Experimental Medicine*, 191(10), pp. 1649–1660. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.191.10.1649>.

Münz, C. (2019) 'Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis', *Nature Reviews. Microbiology*, 17(11), pp. 691–700. Available at:

<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0249-7>.

Murat, P. *et al.* (2014) ‘G-quadruplexes regulate Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 mRNA translation’, *Nature Chemical Biology*, 10(5), pp. 358–364. Available at: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1479>.

Musso, T. *et al.* (1994) ‘Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes’, *Blood*, 83(5), pp. 1408–1411.

Mustapha, R. (2016) *Evaluation of novel anti-tumoral strategies using peptide or monoclonal antibody immunotherapies*. These de doctorat. Lille 1. Available at: <https://www.theses.fr/2016LIL10198> (Accessed: 4 December 2022).

Muzio, M. *et al.* (2000) ‘Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(11), pp. 5998–6004. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5998>.

Najjar, I. *et al.* (2005) ‘Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells’, *Journal of Virology*, 79(8), pp. 4936–4943. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.8.4936-4943.2005>.

Nakayama, T. *et al.* (2004) ‘Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus’, *Journal of Virology*, 78(4), pp. 1665–1674. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.4.1665-1674.2004>.

Nambiar, D.K. *et al.* (2019) ‘Galectin-1-driven T cell exclusion in the tumor endothelium promotes immunotherapy resistance’, *The Journal of Clinical Investigation*, 129(12), pp. 5553–5567. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI129025>.

Nanbo, A. *et al.* (2002) ‘Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt’s lymphoma’, *The EMBO journal*, 21(5), pp. 954–965. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.954>.

Nanbo, A. *et al.* (2013) ‘Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells’, *Journal of Virology*, 87(18), pp. 10334–10347. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01310-13>.

Navarro-Barriuso, J. *et al.* (2018) ‘Comparative transcriptomic profile of tolerogenic dendritic cells differentiated with vitamin D3, dexamethasone and rapamycin’, *Scientific Reports*, 8(1), p. 14985. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33248-7>.

Nayyar, A. *et al.* (2012) ‘Induction of prolonged asthma tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells: differential impact on airway hyperresponsiveness and the Th2 immunoinflammatory response’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(1), pp. 72–79. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103286>.

Nazarenko, I. *et al.* (2010) ‘Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways

of exosome-induced endothelial cell activation', *Cancer Research*, 70(4), pp. 1668–1678. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2470>.

Ness, S., Lin, S. and Gordon, J.R. (2021) 'Regulatory Dendritic Cells, T Cell Tolerance, and Dendritic Cell Therapy for Immunologic Disease', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 633436. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.633436>.

Nickles, E. *et al.* (2022) 'Dendritic cell therapy with CD137L-DC-EBV-VAX in locally recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma is safe and confers clinical benefit', *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 71(6), pp. 1531–1543. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03075-3>.

van Niel, G., D'Angelo, G. and Raposo, G. (2018) 'Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(4), pp. 213–228. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.

Nikolic, T. and Roep, B.O. (2013) 'Regulatory multitasking of tolerogenic dendritic cells - lessons taken from vitamin d3-treated tolerogenic dendritic cells', *Frontiers in Immunology*, 4, p. 113. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00113>.

Ning, R.J. *et al.* (2011) 'Long-term carriers generate Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4(+) and CD8(+) polyfunctional T-cell responses which show immunodominance hierarchies of EBV proteins', *Immunology*, 134(2), pp. 161–171. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03476.x>.

Ning, Y. *et al.* (2018) 'Tumor exosomes block dendritic cells maturation to decrease the T cell immune response', *Immunology Letters*, 199, pp. 36–43. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.05.002>.

Nkosi, D. *et al.* (2020) 'Epstein-Barr virus LMP1 manipulates the content and functions of extracellular vesicles to enhance metastatic potential of recipient cells', *PLoS pathogens*, 16(12), p. e1009023. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009023>.

Nobumoto, A. *et al.* (2008) 'Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices', *Glycobiology*, 18(9), pp. 735–744. Available at: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn062>.

Ohno, S. *et al.* (2013) 'Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells', *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(1), pp. 185–191. Available at: <https://doi.org/10.1038/mt.2012.180>.

Ohue, Y. and Nishikawa, H. (2019) 'Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target?', *Cancer Science*, 110(7), pp. 2080–2089. Available at: <https://doi.org/10.1111/cas.14069>.

Ok, C.Y. *et al.* (2013) 'EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly', *Blood*, 122(3), pp. 328–340. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-489708>.

O'Keefe, M., Mok, W.H. and Radford, K.J. (2015) 'Human dendritic cell subsets and function in health and disease', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 72(22), pp. 4309–4325.

Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2005-0>.

Old, L.J. *et al.* (1966) 'Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured burkitt's lymphoma cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(6), pp. 1699–1704. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.56.6.1699>.

O'Neill, L.A.J. and Pearce, E.J. (2016) 'Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function', *The Journal of Experimental Medicine*, 213(1), pp. 15–23. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20151570>.

Ostrowski, M. *et al.* (2010) 'Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway', *Nature Cell Biology*, 12(1), pp. 19–30; sup pp 1-13. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb2000>.

Ott, P.A. and Hodi, F.S. (2013) 'The B7-H1/PD-1 pathway in cancers associated with infections and inflammation: opportunities for therapeutic intervention', *Chinese Clinical Oncology*, 2(1), p. 7. Available at: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3865.2012.11.05>.

Ouyang, W. and O'Garra, A. (2019) 'IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation', *Immunity*, 50(4), pp. 871–891. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>.

Palendira, U. and Rickinson, A.B. (2015) 'Primary immunodeficiencies and the control of Epstein-Barr virus infection', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1356, pp. 22–44. Available at: <https://doi.org/10.1111/nyas.12937>.

Panikkar, A. *et al.* (2015) 'Cytokine-Mediated Loss of Blood Dendritic Cells During Epstein-Barr Virus-Associated Acute Infectious Mononucleosis: Implication for Immune Dysregulation', *The Journal of Infectious Diseases*, 212(12), pp. 1957–1961. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv340>.

Pappworth, I.Y., Wang, E.C. and Rowe, M. (2007) 'The switch from latent to productive infection in Epstein-Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing', *Journal of Virology*, 81(2), pp. 474–482. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01777-06>.

Paramita, D.K. *et al.* (2011) 'Humoral immune responses to Epstein-Barr virus encoded tumor associated proteins and their putative extracellular domains in nasopharyngeal carcinoma patients and regional controls', *Journal of Medical Virology*, 83(4), pp. 665–678. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.21960>.

Parolini, I. *et al.* (2009) 'Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp. 34211–34222. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041152>.

Patente, T.A. *et al.* (2018) 'Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 3176. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03176>.

Pathmanathan, R. *et al.* (1995) 'Undifferentiated, nonkeratinizing, and squamous cell

carcinoma of the nasopharynx. Variants of Epstein-Barr virus-infected neoplasia', *The American Journal of Pathology*, 146(6), pp. 1355–1367.

Pearce, E.J. and Everts, B. (2015) 'Dendritic cell metabolism', *Nature Reviews Immunology*, 15(1), pp. 18–29. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3771>.

Pearce, E.L. *et al.* (2013) 'Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function', *Science (New York, N.Y.)*, 342(6155), p. 1242454. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1242454>.

Peng, X. *et al.* (2021) 'Metabolism of Dendritic Cells in Tumor Microenvironment: For Immunotherapy', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 613492. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.613492>.

Peng, Y. *et al.* (2020) 'microRNA-18a from M2 Macrophages Inhibits TGFBR3 to Promote Nasopharyngeal Carcinoma Progression and Tumor Growth via TGF- β Signaling Pathway', *Nanoscale Research Letters*, 15(1), p. 196. Available at: <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03416-8>.

Picard, C. *et al.* (2015) 'Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015', *Journal of Clinical Immunology*, 35(8), pp. 696–726. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0201-1>.

Pioche-Durieu, C. *et al.* (2005) 'In nasopharyngeal carcinoma cells, Epstein-Barr virus LMP1 interacts with galectin 9 in membrane raft elements resistant to simvastatin', *Journal of Virology*, 79(21), pp. 13326–13337. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13326-13337.2005>.

Png, Y.T. *et al.* (2021) 'The Role of NK Cells in EBV Infection and EBV-Associated NPC', *Viruses*, 13(2), p. 300. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13020300>.

Pollizzi, K.N. and Powell, J.D. (2014) 'Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses', *Nature Reviews. Immunology*, 14(7), pp. 435–446. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3701>.

Precopio, M.L. *et al.* (2003) 'Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(5), pp. 2590–2598. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2590>.

Proietto, A.I. *et al.* (2012) 'The equivalents of human blood and spleen dendritic cell subtypes can be generated in vitro from human CD34(+) stem cells in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand and thrombopoietin', *Cellular & Molecular Immunology*, 9(6), pp. 446–454. Available at: <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.48>.

Provoost, S. *et al.* (2012) 'Monocyte-derived dendritic cell recruitment and allergic T(H)2 responses after exposure to diesel particles are CCR2 dependent', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(2), pp. 483–491. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.07.051>.

Qiu, J. *et al.* (2018) 'Extracellular vesicles as mediators of the progression and chemoresistance of pancreatic cancer and their potential clinical applications', *Molecular Cancer*, 17(1), p. 2. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0755-z>.

Quan, T.E. *et al.* (2010) 'Epstein-Barr virus promotes interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells', *Arthritis and Rheumatism*, 62(6), pp. 1693–1701. Available at: <https://doi.org/10.1002/art.27408>.

Querol Cano, L. *et al.* (2019) 'Intracellular Galectin-9 Controls Dendritic Cell Function by Maintaining Plasma Membrane Rigidity', *iScience*, 22, pp. 240–255. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.019>.

Raab-Traub, N. (2015) 'Nasopharyngeal Carcinoma: An Evolving Role for the Epstein-Barr Virus', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 390(Pt 1), pp. 339–363. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_14.

Rana, S. *et al.* (2012) 'Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9), pp. 1574–1584. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.018>.

Raposo, G. *et al.* (1996) 'B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles', *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), pp. 1161–1172. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>.

Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013) 'Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends', *The Journal of Cell Biology*, 200(4), pp. 373–383. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.

Rehman, A. *et al.* (2013) 'Role of fatty-acid synthesis in dendritic cell generation and function', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(9), pp. 4640–4649. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202312>.

Reis e Sousa, C. (2006) 'Dendritic cells in a mature age', *Nature Reviews. Immunology*, 6(6), pp. 476–483. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri1845>.

Reizis, B. *et al.* (2011) 'Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions', *Annual Review of Immunology*, 29, pp. 163–183. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101345>.

Renaud, S. *et al.* (2020) 'Novel Therapies Boosting T Cell Immunity in Epstein Barr Virus-Associated Nasopharyngeal Carcinoma', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), p. E4292. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21124292>.

Ressing, M.E. *et al.* (2003) 'Interference with T cell receptor-HLA-DR interactions by Epstein-Barr virus gp42 results in reduced T helper cell recognition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), pp. 11583–11588. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2034960100>.

Reynolds, G. and Haniffa, M. (2015) 'Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species?', *Frontiers in Immunology*, 6, p. 330. Available at:

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00330>.

Richards, D.M., Hettinger, J. and Feuerer, M. (2013) ‘Monocytes and macrophages in cancer: development and functions’, *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 6(2), pp. 179–191. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0123-x>.

Richmon, J.D. (2015) ‘Transoral palate-sparing nasopharyngectomy with the Flex® System: preclinical study’, *The Laryngoscope*, 125(2), pp. 318–322. Available at: <https://doi.org/10.1002/lary.24918>.

Robbins, P.D. and Morelli, A.E. (2014) ‘Regulation of immune responses by extracellular vesicles’, *Nature Reviews. Immunology*, 14(3), pp. 195–208. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3622>.

Roberts, E.W. *et al.* (2016) ‘Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma’, *Cancer Cell*, 30(2), pp. 324–336. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.003>.

Rock, K.L. and Shen, L. (2005) ‘Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance’, *Immunological Reviews*, 207, pp. 166–183. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x>.

Rowe, M. *et al.* (2007) ‘Host shutoff during productive Epstein-Barr virus infection is mediated by BGLF5 and may contribute to immune evasion’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), pp. 3366–3371. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0611128104>.

Rubtsov, A.V. *et al.* (2011) ‘Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c⁺ B-cell population is important for the development of autoimmunity’, *Blood*, 118(5), pp. 1305–1315. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331462>.

Rubtsov, Y.P. and Rudensky, A.Y. (2007) ‘TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity’, *Nature Reviews. Immunology*, 7(6), pp. 443–453. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2095>.

Ruez, R. *et al.* (2018) ‘Dendritic Cell Migration Toward CCL21 Gradient Requires Functional Cx43’, *Frontiers in Physiology*, 9, p. 288. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00288>.

Ruf, I.K. *et al.* (2005) ‘Protection from interferon-induced apoptosis by Epstein-Barr virus small RNAs is not mediated by inhibition of PKR’, *Journal of Virology*, 79(23), pp. 14562–14569. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14562-14569.2005>.

Sadik, A. *et al.* (2020) ‘IL4I1 Is a Metabolic Immune Checkpoint that Activates the AHR and Promotes Tumor Progression’, *Cell*, 182(5), pp. 1252-1270.e34. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.038>.

Salek-Ardakani, S., Arrand, J.R. and Mackett, M. (2002) ‘Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes:

implications for immune evasion by EBV', *Virology*, 304(2), pp. 342–351. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1716>.

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994) 'Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha', *The Journal of Experimental Medicine*, 179(4), pp. 1109–1118. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1109>.

Sana, G. *et al.* (2014) 'Adult human hepatocytes promote CD4(+) T-cell hyporesponsiveness via interleukin-10-producing allogeneic dendritic cells', *Cell Transplantation*, 23(9), pp. 1127–1142. Available at: <https://doi.org/10.3727/096368913X666421>.

Sánchez-Paulete, A.R. *et al.* (2017) 'Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy', *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(suppl_12), pp. xii44–xii55. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx237>.

Santos, P.M. *et al.* (2019) 'Tumor-Derived α -Fetoprotein Suppresses Fatty Acid Metabolism and Oxidative Phosphorylation in Dendritic Cells', *Cancer Immunology Research*, 7(6), pp. 1001–1012. Available at: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0513>.

Sathaliyawala, T. *et al.* (2010) 'Mammalian target of rapamycin controls dendritic cell development downstream of Flt3 ligand signaling', *Immunity*, 33(4), pp. 597–606. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.012>.

Sato, K. *et al.* (1999) 'CC chemokine receptors, CCR-1 and CCR-3, are potentially involved in antigen-presenting cell function of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells', *Blood*, 93(1), pp. 34–42.

Sato, T. *et al.* (2013) 'Human CD1c⁺ myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D₃', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 191(6), pp. 3152–3160. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203517>.

Schneider, N. *et al.* (2015) 'Dexamethasone and azathioprine promote cytoskeletal changes and affect mesenchymal stem cell migratory behavior', *PloS One*, 10(3), p. e0120538. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120538>.

Schuler, G. and Steinman, R.M. (1985) 'Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro', *The Journal of Experimental Medicine*, 161(3), pp. 526–546. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.161.3.526>.

Segura, E. *et al.* (2012) 'Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes', *The Journal of Experimental Medicine*, 209(4), pp. 653–660. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20111457>.

Segura, E. *et al.* (2013) 'Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation', *Immunity*, 38(2), pp. 336–348. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.018>.

Segura, E. and Amigorena, S. (2015) 'Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells', *Advances in Immunology*, 127, pp. 1–31. Available at:

<https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.03.002>.

Seki, M. *et al.* (2008) ‘Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis’, *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 127(1), pp. 78–88. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.01.006>.

Serbina, N.V. *et al.* (2003) ‘TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection’, *Immunity*, 19(1), pp. 59–70. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00171-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00171-7).

Severa, M. *et al.* (2013) ‘EBV stimulates TLR- and autophagy-dependent pathways and impairs maturation in plasmacytoid dendritic cells: implications for viral immune escape’, *European Journal of Immunology*, 43(1), pp. 147–158. Available at: <https://doi.org/10.1002/eji.201242552>.

Shah, K.M. *et al.* (2009) ‘The EBV-encoded latent membrane proteins, LMP2A and LMP2B, limit the actions of interferon by targeting interferon receptors for degradation’, *Oncogene*, 28(44), pp. 3903–3914. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2009.249>.

Shannon-Lowe, C. and Rickinson, A. (2019) ‘The Global Landscape of EBV-Associated Tumors’, *Frontiers in Oncology*, 9, p. 713. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00713>.

Shapiro, R.S. *et al.* (1988) ‘Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation’, *Blood*, 71(5), pp. 1234–1243.

Sharma, N. *et al.* (2021) ‘LILRB4 suppresses immunity in solid tumors and is a potential target for immunotherapy’, *The Journal of Experimental Medicine*, 218(7), p. e20201811. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20201811>.

Shebl, F.M., Bhatia, K. and Engels, E.A. (2010) ‘Salivary gland and nasopharyngeal cancers in individuals with acquired immunodeficiency syndrome in United States’, *International Journal of Cancer*, 126(10), pp. 2503–2508. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.24930>.

Shevach, E.M. (2009) ‘Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression’, *Immunity*, 30(5), pp. 636–645. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.010>.

Shi, S. *et al.* (2016) ‘Mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitate nasopharyngeal carcinoma progression’, *American Journal of Cancer Research*, 6(2), pp. 459–472.

Shibata, D. *et al.* (1991) ‘Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma’, *The American Journal of Pathology*, 139(3), pp. 469–474.

Shivappa, N. *et al.* (2016) ‘Increased Risk of Nasopharyngeal Carcinoma with Increasing Levels of Diet-Associated Inflammation in an Italian Case-Control Study’, *Nutrition and Cancer*, 68(7), pp. 1123–1130. Available at: <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1216137>.

Shurin, M.R. *et al.* (1999) ‘Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy’, *Springer Seminars in Immunopathology*, 21(3), pp. 339–359. Available at:

<https://doi.org/10.1007/BF00812261>.

Sim, W.J., Ahl, P.J. and Connolly, J.E. (2016) 'Metabolism Is Central to Tolerogenic Dendritic Cell Function', *Mediators of Inflammation*, 2016, p. 2636701. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/2636701>.

Singh, S., Anshita, D. and Ravichandiran, V. (2021) 'MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease', *International Immunopharmacology*, 101(Pt B), p. 107598. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>.

Siti-Azrin, A.H., Norsahadah, B. and Naing, N.N. (2017) 'Prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma patients in a tertiary referral hospital: a retrospective cohort study', *BMC research notes*, 10(1), p. 705. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2990-1>.

Skalsky, R.L. *et al.* (2012) 'The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines', *PLoS pathogens*, 8(1), p. e1002484. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002484>.

Skalsky, R.L. and Cullen, B.R. (2015) 'EBV Noncoding RNAs', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 391, pp. 181–217. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_6.

Soldan, S.S. and Lieberman, P.M. (2022) 'Epstein-Barr virus and multiple sclerosis', *Nature Reviews. Microbiology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00770-5>.

Song, S. *et al.* (2014) 'Dendritic cells with an increased PD-L1 by TGF- β induce T cell anergy for the cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells', *International Immunopharmacology*, 20(1), pp. 117–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.027>.

Spitzenberger, F., Graessler, J. and Schroeder, H.E. (2001) 'Molecular and functional characterization of galectin 9 mRNA isoforms in porcine and human cells and tissues', *Biochimie*, 83(9), pp. 851–862. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01335-9](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01335-9).

Ståhl, S. *et al.* (2017) 'Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications', *Trends in Biotechnology*, 35(8), pp. 691–712. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.007>.

Steinman, R.M. *et al.* (2003) 'Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 987, pp. 15–25. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb06029.x>.

Steinman, R.M., Adams, J.C. and Cohn, Z.A. (1975) 'Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen', *The Journal of Experimental Medicine*, 141(4), pp. 804–820.

Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. (1973) 'Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution', *The Journal of Experimental Medicine*, 137(5), pp. 1142–1162. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>.

Steinman, R.M., Hawiger, D. and Nussenzweig, M.C. (2003) 'Tolerogenic dendritic cells', *Annual Review of Immunology*, 21, pp. 685–711. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040>.

Steinman, R.M. and Swanson, J. (1995) 'The endocytic activity of dendritic cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 182(2), pp. 283–288. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.283>.

Stewart, S. *et al.* (2004) 'Epstein-Barr virus-encoded LMP2A regulates viral and cellular gene expression by modulation of the NF-kappaB transcription factor pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), pp. 15730–15735. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0402135101>.

Strockbine, L.D. *et al.* (1998) 'The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor', *Journal of Virology*, 72(5), pp. 4015–4021. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.72.5.4015-4021.1998>.

Su, Z.Y. *et al.* (2022) 'Nasopharyngeal Carcinoma and Its Microenvironment: Past, Current, and Future Perspectives', *Frontiers in Oncology*, 12, p. 840467. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.840467>.

Subklewe, M. *et al.* (2001) 'Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8(+) killer T cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 193(3), pp. 405–411. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.193.3.405>.

Subra, C. *et al.* (2010) 'Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins', *Journal of Lipid Research*, 51(8), pp. 2105–2120. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>.

Sulik, A. *et al.* (2014) 'Epstein-Barr virus effect on frequency of functionally distinct T cell subsets in children with infectious mononucleosis', *Advances in Medical Sciences*, 59(2), pp. 227–231. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2014.04.003>.

Sun, D. *et al.* (2010) 'A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes', *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(9), pp. 1606–1614. Available at: <https://doi.org/10.1038/mt.2010.105>.

Sung, H. *et al.* (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), pp. 209–249. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

Süss, G. and Shortman, K. (1996) 'A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis', *The Journal of Experimental Medicine*, 183(4), pp. 1789–1796. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1789>.

Swanson-Mungerson, M., Bultema, R. and Longnecker, R. (2010) 'Epstein-Barr virus LMP2A imposes sensitivity to apoptosis', *The Journal of General Virology*, 91(Pt 9), pp. 2197–2202. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.021444-0>.

Tagawa, T. *et al.* (2016) ‘Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4⁺ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing’, *The Journal of Experimental Medicine*, 213(10), pp. 2065–2080. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20160248>.

Takada, K. (2012) ‘Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis’, *Seminars in Cancer Biology*, 22(2), pp. 162–165. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.007>.

Takegawa, S. *et al.* (2008) ‘Expression of CCL17 and CCL22 by latent membrane protein 1-positive tumor cells in age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorder’, *Cancer Science*, 99(2), pp. 296–302. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00687.x>.

Takeuchi, K. *et al.* (2006) ‘Prevalence of Epstein-Barr virus in Japan: trends and future prediction’, *Pathology International*, 56(3), pp. 112–116. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2006.01936.x>.

Tang, M. *et al.* (2010) ‘Haplotype-dependent HLA susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Southern Chinese population’, *Genes and Immunity*, 11(4), pp. 334–342. Available at: <https://doi.org/10.1038/gene.2009.109>.

Taylor, G.S. *et al.* (2014) ‘A recombinant modified vaccinia ankara vaccine encoding Epstein-Barr Virus (EBV) target antigens: a phase I trial in UK patients with EBV-positive cancer’, *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(19), pp. 5009–5022. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1122-T>.

Taylor, G.S. *et al.* (2015) ‘The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease’, *Annual Review of Immunology*, 33, pp. 787–821. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112326>.

Tellam, J.T. *et al.* (2012) ‘Messenger RNA sequence rather than protein sequence determines the level of self-synthesis and antigen presentation of the EBV-encoded antigen, EBNA1’, *PLoS pathogens*, 8(12), p. e1003112. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003112>.

Terness, P. *et al.* (2002) ‘Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites’, *The Journal of Experimental Medicine*, 196(4), pp. 447–457. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20020052>.

de-Thé, G. *et al.* (1975) ‘Sero-epidemiology of the Epstein-Barr virus: preliminary analysis of an international study - a review’, *IARC scientific publications*, (11 Pt 2), pp. 3–16.

Théry, C. *et al.* (2018) ‘Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines’, *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), p. 1535750. Available at: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.

Théry, C., Ostrowski, M. and Segura, E. (2009) ‘Membrane vesicles as conveyors of immune

responses', *Nature Reviews. Immunology*, 9(8), pp. 581–593. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2567>.

Thomas, D.C. *et al.* (2013) 'Protection of islet grafts through transforming growth factor- β -induced tolerogenic dendritic cells', *Diabetes*, 62(9), pp. 3132–3142. Available at: <https://doi.org/10.2337/db12-1740>.

Thorley-Lawson, D.A. (2015) 'EBV Persistence--Introducing the Virus', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 390(Pt 1), pp. 151–209. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8.

Thorley-Lawson, D.A. and Gross, A. (2004) 'Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas', *The New England Journal of Medicine*, 350(13), pp. 1328–1337. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra032015>.

Tian, X. *et al.* (2019) 'Tumor-derived exosomes, myeloid-derived suppressor cells, and tumor microenvironment', *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), p. 84. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0772-z>.

Tian, Y. *et al.* (2014) 'A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy', *Biomaterials*, 35(7), pp. 2383–2390. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083>.

Trombetta, E.S. and Mellman, I. (2005) 'Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo', *Annual Review of Immunology*, 23, pp. 975–1028. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538>.

Tsai, C.-Y. *et al.* (2018) 'Bystander inhibition of humoral immune responses by Epstein-Barr virus LMP1', *International Immunology*, 30(12), pp. 579–590. Available at: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy053>.

Tsang, R.K. *et al.* (2015) 'Early results of robotic assisted nasopharyngectomy for recurrent nasopharyngeal carcinoma', *Head & Neck*, 37(6), pp. 788–793. Available at: <https://doi.org/10.1002/hed.23672>.

Tu, L. *et al.* (2017) 'Interleukin-4 Inhibits Regulatory T Cell Differentiation through Regulating CD103+ Dendritic Cells', *Frontiers in Immunology*, 8, p. 214. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00214>.

Valentine, R. *et al.* (2010) 'Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 inhibits the canonical NF- κ B pathway in carcinoma cells by inhibiting IKK phosphorylation', *Molecular Cancer*, 9, p. 1. Available at: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-1>.

Verghese, P.S. *et al.* (2015) 'Valganciclovir administration to kidney donors to reduce the burden of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus transmission during transplantation', *Transplantation*, 99(6), pp. 1186–1191. Available at: <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000490>.

Verweij, F.J. *et al.* (2011) 'LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- κ B activation', *The EMBO journal*, 30(11), pp. 2115–2129.

Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.123>.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W. and Workman, C.J. (2008) 'How regulatory T cells work', *Nature Reviews. Immunology*, 8(7), pp. 523–532. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2343>.

Villadangos, J.A. and Young, L. (2008) 'Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells', *Immunity*, 29(3), pp. 352–361. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.002>.

Villani, A.-C. *et al.* (2017) 'Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors', *Science (New York, N.Y.)*, 356(6335), p. eaah4573. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aah4573>.

Vlassov, A.V. *et al.* (2012) 'Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1820(7), pp. 940–948. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017>.

Vockerodt, M. *et al.* (2005) 'The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 induces expression of the chemokine IP-10: importance of mRNA half-life regulation', *International Journal of Cancer*, 114(4), pp. 598–605. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.20759>.

Volchenkov, R. *et al.* (2013) 'In vitro suppression of immune responses using monocyte-derived tolerogenic dendritic cells from patients with primary Sjögren's syndrome', *Arthritis Research & Therapy*, 15(5), p. R114. Available at: <https://doi.org/10.1186/ar4294>.

Von Bubnoff, D. *et al.* (2011) 'Identification of IDO-positive and IDO-negative human dendritic cells after activation by various proinflammatory stimuli', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(12), pp. 6701–6709. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003151>.

Waldman, W.J. *et al.* (2008) 'Epstein-Barr virus-encoded dUTPase enhances proinflammatory cytokine production by macrophages in contact with endothelial cells: evidence for depression-induced atherosclerotic risk', *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(2), pp. 215–223. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.07.007>.

Wang, C. *et al.* (2016) 'Diet Quality Scores and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma in Chinese Adults: A Case-Control Study', *Nutrients*, 8(3), p. 112. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu8030112>.

Wang, H.-Y. *et al.* (2016) 'A new prognostic histopathologic classification of nasopharyngeal carcinoma', *Chinese Journal of Cancer*, 35, p. 41. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0103-5>.

Wang, J. *et al.* (2017) 'Tumor cells induced-M2 macrophage favors accumulation of Treg in nasopharyngeal carcinoma', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(8), pp. 8389–8401.

Wang, Jianguo *et al.* (2020) 'Exosomal Delivery of AntagomiRs Targeting Viral and Cellular MicroRNAs Synergistically Inhibits Cancer Angiogenesis', *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 22, pp. 153–165. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.08.017>.

- Wang, Jie *et al.* (2020) ‘Mechanisms of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 favor Tregs accumulation in nasopharyngeal carcinoma’, *Cancer Medicine*, 9(15), pp. 5598–5608. Available at: <https://doi.org/10.1002/cam4.3213>.
- Wang, J.-T. *et al.* (2009) ‘Epstein-Barr virus BGLF4 kinase suppresses the interferon regulatory factor 3 signaling pathway’, *Journal of Virology*, 83(4), pp. 1856–1869. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01099-08>.
- Wang, L. *et al.* (2014) ‘Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) protein induction of epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma cells’, *Cancer*, 120(3), pp. 363–372. Available at: <https://doi.org/10.1002/cncr.28418>.
- Wang, L. and Ning, S. (2021) ‘New Look of EBV LMP1 Signaling Landscape’, *Cancers*, 13(21), p. 5451. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13215451>.
- Wang, M. *et al.* (2018) ‘Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as regulators in host immune responses’, *International Journal of Biological Sciences*, 14(5), pp. 565–576. Available at: <https://doi.org/10.7150/ijbs.24562>.
- Wang, R. *et al.* (2011) ‘The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation’, *Immunity*, 35(6), pp. 871–882. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.021>.
- Watchmaker, P.B. *et al.* (2014) ‘Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice’, *Nature Immunology*, 15(1), pp. 98–108. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.2768>.
- Weiss, R. *et al.* (2018) ‘Differential Interaction of Platelet-Derived Extracellular Vesicles with Leukocyte Subsets in Human Whole Blood’, *Scientific Reports*, 8(1), p. 6598. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25047-x>.
- Williams, H. *et al.* (2005) ‘The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells’, *British Journal of Haematology*, 129(2), pp. 266–274. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05452.x>.
- Wingate, P.J. *et al.* (2009) ‘Regulatory T cell activity in primary and persistent Epstein-Barr virus infection’, *Journal of Medical Virology*, 81(5), pp. 870–877. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.21445>.
- Winzler, C. *et al.* (1997) ‘Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures’, *The Journal of Experimental Medicine*, 185(2), pp. 317–328. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.185.2.317>.
- Wolf, Y., Anderson, A.C. and Kuchroo, V.K. (2020) ‘TIM3 comes of age as an inhibitory receptor’, *Nature Reviews. Immunology*, 20(3), pp. 173–185. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0224-6>.
- Wong, K.C.W. *et al.* (2021) ‘Nasopharyngeal carcinoma: an evolving paradigm’, *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 18(11), pp. 679–695. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00524-x>.

- Wood, V.H.J. *et al.* (2007) 'Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFbeta signaling pathways', *Oncogene*, 26(28), pp. 4135–4147. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210496>.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S.I. and Förster, R. (2017) 'Dendritic cell migration in health and disease', *Nature Reviews. Immunology*, 17(1), pp. 30–48. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.116>.
- Wu, C. *et al.* (2014) 'Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells', *Immunity*, 41(2), pp. 270–282. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.011>.
- Wu, L. *et al.* (2009) 'Epstein-Barr virus LF2: an antagonist to type I interferon', *Journal of Virology*, 83(2), pp. 1140–1146. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00602-08>.
- Xie, F.T. *et al.* (2015) 'IDO expressing dendritic cells suppress allograft rejection of small bowel transplantation in mice by expansion of Foxp3+ regulatory T cells', *Transplant Immunology*, 33(2), pp. 69–77. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trim.2015.05.003>.
- Xie, S.-H. *et al.* (2013) 'Sex difference in the incidence of nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong 1983-2008: suggestion of a potential protective role of oestrogen', *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 49(1), pp. 150–155. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.07.004>.
- Xu, D., Brumm, K. and Zhang, L. (2006) 'The latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus (EBV) primes EBV latency cells for type I interferon production', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(14), pp. 9163–9169. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M511884200>.
- Xu, M. *et al.* (2019) 'Genome sequencing analysis identifies Epstein-Barr virus subtypes associated with high risk of nasopharyngeal carcinoma', *Nature Genetics*, 51(7), pp. 1131–1136. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0436-5>.
- Xu, T. *et al.* (2014) 'Prognostic significance of circulating CD19+ B lymphocytes in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma', *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 31(10), p. 198. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0198-y>.
- Xu, X. *et al.* (2012) 'Splenic stroma-educated regulatory dendritic cells induce apoptosis of activated CD4 T cells via Fas ligand-enhanced IFN- γ and nitric oxide', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(3), pp. 1168–1177. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101696>.
- Xu, Y. *et al.* (2018) 'Analysis of the Expression of Surface Receptors on NK Cells and NKG2D on Immunocytes in Peripheral Blood of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma', *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 19(3), pp. 661–665. Available at: <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.3.661>.
- Xu, Z. *et al.* (2020) 'Exosome-based immunotherapy: a promising approach for cancer treatment', *Molecular Cancer*, 19(1), p. 160. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01278-3>.

Yamauchi, A. *et al.* (2005) '[Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells]', *Nihon Rinsho Men'eki Gakkai Kaishi = Japanese Journal of Clinical Immunology*, 28(6), pp. 381–388. Available at: <https://doi.org/10.2177/jsci.28.381>.

Yan, Q. *et al.* (2015) 'EBV-miR-BART10-3p facilitates epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting BTRC', *Oncotarget*, 6(39), pp. 41766–41782. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6155>.

Yan, Y. *et al.* (2010) 'IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(10), pp. 5953–5961. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001628>.

Yan, Y., Fu, G. and Ming, L. (2018) 'Role of exosomes in pancreatic cancer', *Oncology Letters*, 15(5), pp. 7479–7488. Available at: <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8348>.

Yáñez-Mó, M. *et al.* (2015) 'Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions', *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, p. 27066. Available at: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.

Yang, C.-F. *et al.* (2014) 'Cancer stem-like cell characteristics induced by EB virus-encoded LMP1 contribute to radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by suppressing the p53-mediated apoptosis pathway', *Cancer Letters*, 344(2), pp. 260–271. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.006>.

Yang, J. *et al.* (2016) 'CCL2-CCR2 axis promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by activating ERK1/2-MMP2/9 pathway', *Oncotarget*, 7(13), pp. 15632–15647. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6695>.

Yang, T. *et al.* (2020) 'Association of Ambient Air Pollution with Nasopharyngeal Carcinoma Incidence in Ten Large Chinese Cities, 2006-2013', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), p. E1824. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph17061824>.

Yang, X.R. *et al.* (2005) 'Evaluation of risk factors for nasopharyngeal carcinoma in high-risk nasopharyngeal carcinoma families in Taiwan', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(4), pp. 900–905. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0680>.

Yanru, G. *et al.* (2022) *EBV LMP1-C terminal binding affibody molecule downregulates MEK/ERK/p90RSK pathway and inhibits the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells in mouse tumor xenograft models*. Available at: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1937827/v1>.

Ye, S.-B. *et al.* (2014) 'Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma', *Oncotarget*, 5(14), pp. 5439–5452. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2118>.

Ye, S.-B. *et al.* (2016) 'Exosomal miR-24-3p impedes T-cell function by targeting FGF11 and

serves as a potential prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma', *The Journal of Pathology*, 240(3), pp. 329–340. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.4781>.

Ye, Y.-F. *et al.* (2015) 'Hepatitis B virus infection and risk of nasopharyngeal carcinoma in southern China', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(11), pp. 1766–1773. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0344>.

Yoo, S. and Ha, S.-J. (2016) 'Generation of Tolerogenic Dendritic Cells and Their Therapeutic Applications', *Immune Network*, 16(1), pp. 52–60. Available at: <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.1.52>.

You, R. *et al.* (2015) 'Salvage endoscopic nasopharyngectomy is superior to intensity-modulated radiation therapy for local recurrence of selected T1-T3 nasopharyngeal carcinoma – A case-matched comparison', *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 115(3), pp. 399–406. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.04.024>.

Young, J.W. and Steinman, R.M. (1990) 'Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 171(4), pp. 1315–1332. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.171.4.1315>.

Yu, W.M. and Hussain, S.S.M. (2009) 'Incidence of nasopharyngeal carcinoma in Chinese immigrants, compared with Chinese in China and South East Asia: review', *The Journal of Laryngology and Otology*, 123(10), pp. 1067–1074. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0022215109005623>.

Yuan, F. and Zhou, Z.-F. (2021) 'Exosomes derived from Taxol-resistant nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells transferred DDX53 to NPC cells and promoted cancer resistance to Taxol', *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(1), pp. 127–138. Available at: https://doi.org/10.26355/eurrev_202101_24375.

Yue, S. *et al.* (2015) 'The tetraspanins CD151 and Tspan8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding', *Oncotarget*, 6(4), pp. 2366–2384. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2958>.

Zaccagnino, P. *et al.* (2012) 'An active mitochondrial biogenesis occurs during dendritic cell differentiation', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(11), pp. 1962–1969. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.07.024>.

Zeng, Y. *et al.* (1985) 'Prospective studies on nasopharyngeal carcinoma in Epstein-Barr virus IgA/VCA antibody-positive persons in Wuzhou City, China', *International Journal of Cancer*, 36(5), pp. 545–547. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910360505>.

Zeng, Y. *et al.* (2020) 'LMP2-DC Vaccine Elicits Specific EBV-LMP2 Response to Effectively Improve Immunotherapy in Patients with Nasopharyngeal Cancer', *Biomedical and environmental sciences: BES*, 33(11), pp. 849–856. Available at: <https://doi.org/10.3967/bes2020.115>.

Zeyda, M. *et al.* (2005) ‘Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independently of NF-kappaB activation’, *The Journal of Biological Chemistry*, 280(14), pp. 14293–14301. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M410000200>.

Zhang, C.-X. *et al.* (2020) ‘Galectin-9 promotes a suppressive microenvironment in human cancer by enhancing STING degradation’, *Oncogenesis*, 9(7), p. 65. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41389-020-00248-0>.

Zhang, G. *et al.* (2015) ‘Circulating Epstein-Barr virus microRNAs miR-BART7 and miR-BART13 as biomarkers for nasopharyngeal carcinoma diagnosis and treatment’, *International Journal of Cancer*, 136(5), pp. E301-312. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.29206>.

Zhang, J. *et al.* (2004) ‘The latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus establishes an antiviral state via induction of interferon-stimulated genes’, *The Journal of Biological Chemistry*, 279(44), pp. 46335–46342. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M403966200>.

Zhang, J. *et al.* (2015) ‘Co-expression of PD-1 and PD-L1 predicts poor outcome in nasopharyngeal carcinoma’, *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 32(3), p. 86. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0501-6>.

Zhang, L. *et al.* (2017) ‘Genomic Analysis of Nasopharyngeal Carcinoma Reveals TME-Based Subtypes’, *Molecular cancer research: MCR*, 15(12), pp. 1722–1732. Available at: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0134>.

Zhang, L. and Pagano, J.S. (2000) ‘Interferon regulatory factor 7 is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1’, *Journal of Virology*, 74(3), pp. 1061–1068. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1061-1068.2000>.

Zhang, L. and Yu, D. (2019) ‘Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity’, *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1871(2), pp. 455–468. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.04.004>.

Zhang, Q. *et al.* (2019) ‘Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma’, *Cell*, 179(4), pp. 829-845.e20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.003>.

Zhang, W. *et al.* (2019) ‘Lipopolysaccharide mediates time-dependent macrophage M1/M2 polarization through the Tim-3/Galectin-9 signalling pathway’, *Experimental Cell Research*, 376(2), pp. 124–132. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.02.007>.

Zhang, X. *et al.* (2020) ‘Human Regulatory Dendritic Cells Develop From Monocytes in Response to Signals From Regulatory and Helper T Cells’, *Frontiers in Immunology*, 11, p. 1982. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01982>.

Zhang, Y. *et al.* (2021) ‘Galectin-9 and PSMB8 overexpression predict unfavorable prognosis in patients with AML’, *Journal of Cancer*, 12(14), pp. 4257–4263. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.53686>.

Zhao, J. *et al.* (2020) ‘Single cell RNA-seq reveals the landscape of tumor and infiltrating immune cells in nasopharyngeal carcinoma’, *Cancer Letters*, 477, pp. 131–143. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.010>.

Zhao, Y. *et al.* (2010) ‘Dual functions of interferon regulatory factors 7C in Epstein-Barr virus-mediated transformation of human B lymphocytes’, *PloS One*, 5(3), p. e9459. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009459>.

Zhaolei, C. *et al.* (2021) ‘Diagnostic and Prognostic Potential of Circulating and Tissue BATF2 in Nasopharyngeal Carcinoma’, *Frontiers in molecular biosciences*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.724373>.

Zheng, H. *et al.* (2016) ‘Whole-exome sequencing identifies multiple loss-of-function mutations of NF- κ B pathway regulators in nasopharyngeal carcinoma’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), pp. 11283–11288. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1607606113>.

Zheng, W. *et al.* (2021) ‘Identification of potential plasma biomarkers in early-stage nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes based on RNA sequencing’, *Cancer Cell International*, 21(1), p. 185. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01881-4>.

Zheng, X.-H. *et al.* (2016) ‘Epstein-Barr virus mir-bart1-5p detection via nasopharyngeal brush sampling is effective for diagnosing nasopharyngeal carcinoma’, *Oncotarget*, 7(4), pp. 4972–4980. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6649>.

Zheng, Y. *et al.* (2020) ‘Exosomes: Multiple-targeted multifunctional biological nanoparticles in the diagnosis, drug delivery, and imaging of cancer cells’, *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 129, p. 110442. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110442>.

Zhou, X. *et al.* (2018) ‘Galectin-9 Expression Predicts Favorable Clinical Outcome in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis’, *Frontiers in Physiology*, 9, p. 452. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00452>.

Zhou, Y. *et al.* (2017) ‘PD-L1 predicts poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma irrespective of PD-1 and EBV-DNA load’, *Scientific Reports*, 7, p. 43627. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep43627>.

Zhou, Y. *et al.* (2018) ‘Exosomes in Nasopharyngeal Carcinoma’, *Journal of Cancer*, 9(5), pp. 767–777. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.22505>.

Zhou, Y. *et al.* (2021) ‘The Role of Exosomes and Their Applications in Cancer’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), p. 12204. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222212204>.

Zhu, C. *et al.* (2005) ‘The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity’, *Nature Immunology*, 6(12), pp. 1245–1252. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni1271>.

Zhu, W. *et al.* (2011) ‘Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(10), pp. 3249–3261. Available at:

<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5436-y>.

Zilionis, R. *et al.* (2019) ‘Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species’, *Immunity*, 50(5), pp. 1317–1334.e10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.009>.

Zitvogel, L. *et al.* (1998) ‘Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes’, *Nature Medicine*, 4(5), pp. 594–600. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>.

Zuo, J. *et al.* (2008) ‘The DNase of gammaherpesviruses impairs recognition by virus-specific CD8⁺ T cells through an additional host shutoff function’, *Journal of Virology*, 82(5), pp. 2385–2393. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01946-07>.

Zuo, J. *et al.* (2009) ‘The Epstein-Barr virus G-protein-coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation’, *PLoS pathogens*, 5(1), p. e1000255. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000255>.

Zuo, L. *et al.* (2017) ‘An update: Epstein-Barr virus and immune evasion via microRNA regulation’, *Virologica Sinica*, 32(3), pp. 175–187. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12250-017-3996-5>.

Zuo, L. *et al.* (2019) ‘Targeting Exosomal EBV-LMP1 Transfer and miR-203 Expression via the NF- κ B Pathway: The Therapeutic Role of Aspirin in NPC’, *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 17, pp. 175–184. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.05.023>.

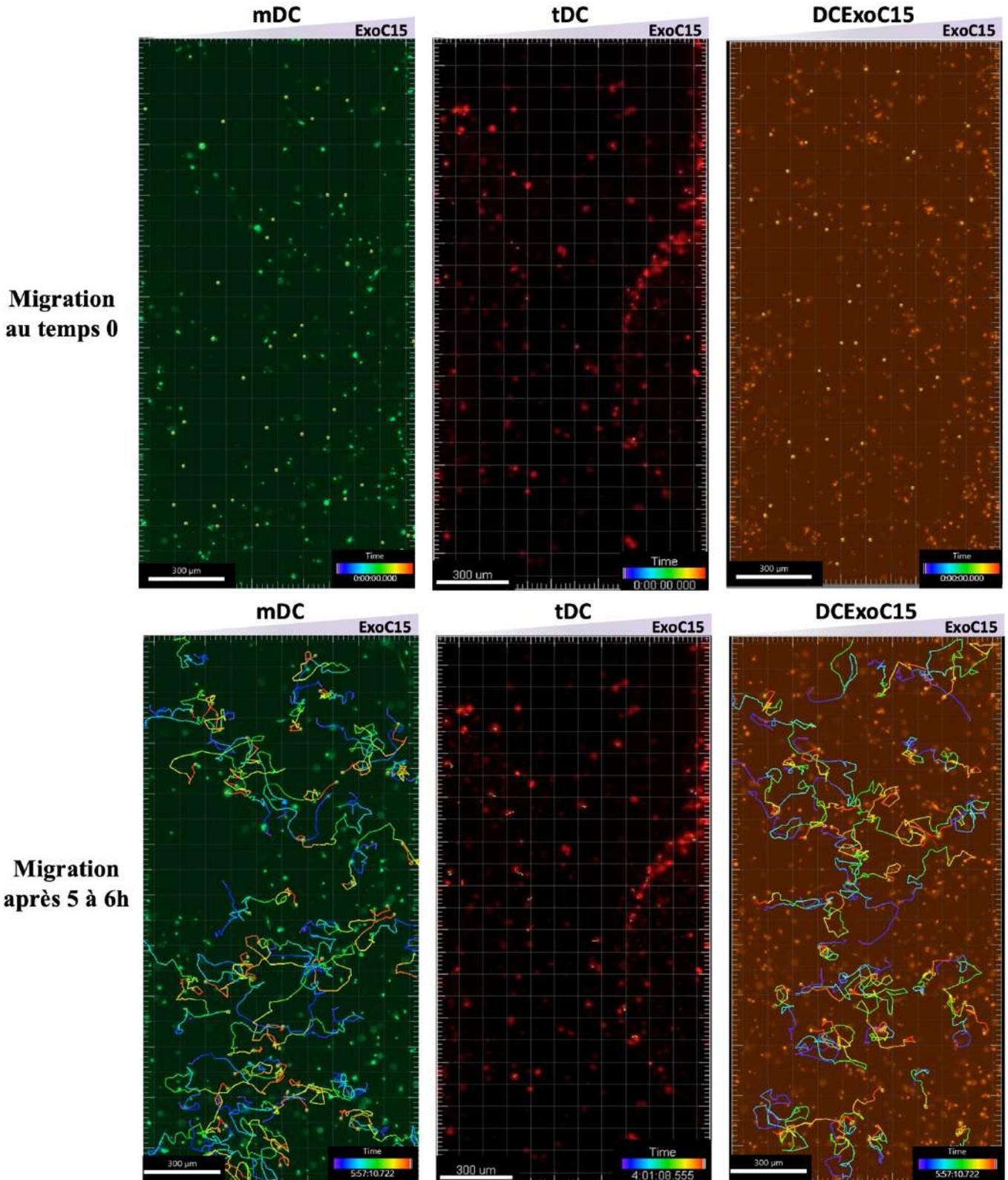
Zuo, X.-Y. *et al.* (2019) ‘X-chromosome association study reveals genetic susceptibility loci of nasopharyngeal carcinoma’, *Biology of Sex Differences*, 10(1), p. 13. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0227-9>.

Zylbersztejn, K. and Galli, T. (2011) ‘Vesicular traffic in cell navigation’, *The FEBS journal*, 278(23), pp. 4497–4505. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08168.x>.

Annexes

Annexe 1 : Représentation de la migration des moDC lors des expériences de chimioattraction.

Image représentative des mDC, tDC et DCExoC15 lors de la migration en présence d'un gradient d'ExoC15.



Liste des communications orales

Juillet 2022 : World Immune Regulation Meeting XVI (WIRM), Davos, Suisse. Travel Grant de 250€ sponsorisé par **European Journal of Immunology**

17 et 18 Mars 2022 : Oncolille PhD Days, Lille, France

7 Décembre 2021 : Journée « Jeunes Chercheuses & Jeunes Chercheurs » de la FSEV (Société Française des Vésicules Extracellulaire), en ligne, France

2021 : 9^{ème} Journée Scientifique **HerPas** en ligne.

3 novembre 2020 : Présentation lors de la réunion annuelle de l'Axe 1 du **Cancéropôle Nord-Ouest**, Rouen

20 au 22 juillet 2020 : Congrès Annuel Virtuel de l'ISEV initialement prévue à Philadelphie, États-Unis. **Lauréat du Grant accordé par la FSEV.**

27 mars 2019 : 8^{ème} journée Scientifique **HerPas (Herpesvirus et Pathologies associées)**, Lyon, France.

Liste des communications écrites

Octobre 2022 : Premier congrès OncoLille Days, Lille, France

Juillet 2022 : World Immune Regulation Meeting XVI (WIRM), Davos, Suisse. Travel Grant de 250€ sponsorisé par **European Journal of Immunology**

Décembre 2021 : Club Francophone des cellules dendritiques (CFCD), Paris, France

13 au 15 Octobre 2021 : 13^{ème} journée scientifique du **Cancéropôle Nord-Ouest**, Deauville, France.

30 Juin au 3 Juillet 2021 : World Immune Regulation Meeting XV (WIRM), Davos, Suisse, en ligne. Grant de 150€

Mai 2021 : The NAT and IGO Joint Meeting « New Horizons in immunotherapy », Nantes, France, en ligne. **Lauréat du premier prix poster, 150€**

14 et 15 octobre 2019 : Congrès Annuel de la FSEV, Nantes, France.

15 au 17 mai 2019 : 12^{ème} journée scientifique du **Cancéropôle Nord-Ouest**, Deauville, France.

Grants

10k€ d'Astra Zeneca pour les translationnelles du **Cancéropôle Nord-Ouest**, 2021 « Photodynamic Therapy with PD-1 Inhibitors for the Treatment of Glioblastoma: A Proof of Concept »

10k€ du Cancéropôle Nord-Ouest pour les translationnelles du **Cancéropôle Nord-Ouest**, 2019 « Exosomes and circulating tumor DNA for monitoring patients with hepatocellular carcinoma treated with chemoembolization » en collaboration avec le laboratoire INSERM U1245 équipe IRON de Rouen

Liste des publications

- Article de thèse, **Anthony Lefebvre**, Camille Trioën, Sarah Renaud, William Laine, Benjamin Hennart Bertrand Leroux, Clément Bouchez, Delphine Allorge, Jérôme Kluza, Elisabeth Werkmeister, Guillaume Grolez, Nadira Delhem*, Olivier Morales*. Nasopharyngeal Carcinoma Exosomes Favor the Emergence IL-4 secreting mature regulatory Dendritic Cells. **Soumission dans Journal of Extracellular Vesicles**
- Geraldine Dahlqvist, Sarah Renaud, Clement Barjon, **Anthony Lefebvre**, Lynda Aoudjehane, Yves Horsmans, Nadira DELHEM, Filomena Conti. Modulatory effect of rapamycin and tacrolimus on monocyte-derived dendritic cells phenotype and function. Immunobiology (En révision 2020). **Original Publication**
- Sarah Renaud, **Anthony Lefebvre**, Serge Mordon, Olivier Moralès and Nadira Delhem. Novel Therapies Boosting T cell Immunity in Epstein Barr Virus-Associated Nasopharyngeal Carcinoma. International Journal of Molecular Sciences 2020. **Review**
- Sarah Renaud, **Anthony Lefebvre**, Olivier Moralès and Nadira Delhem. Mini Review: Exosomes from Discovery to Isolation. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. February, 2019, Volume 15, 2, pp 11286-11293. **Review**
- Sarah Renaud, **Anthony Lefebvre**, Olivier Moralès and Nadira Delhem. Exosomes in Cancer: Biology and Clinical Applications. " Exosomes and Microvesicles: Role in Disease and Clinical Applications". Nova Science Publishers, Inc. 2019. **Book Chapter**

Nasopharyngeal Carcinoma Exosomes Favor the Emergence IL-4 secreting mature regulatory Dendritic Cells

Anthony Lefebvre*, Camille Trioën*, Sarah Renaud, William Laine, Benjamin Hennart, Bertrand Leroux, Clément Bouchez, Delphine Allorge, Jérôme Kluza, Elisabeth Werkmeister, Guillaume Grolez, Nadira Delhem*, Olivier Morales*. (*equally contributing authors)

Soumis dans Journal of Extracellular Vesicles

Résumé :

Le carcinome du nasopharynx (CNP) est caractérisé par un microenvironnement immunosuppresseur régi par les cellules T régulatrices (Treg) et les exosomes tumoraux (TEXs). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact des exosomes de CNP sur la génération de cellules dendritiques matures régulatrices (mregDCs) qui sont des acteurs clés de la régulation immunitaire dans le contexte tumoral contribuant à l'échappement immunitaire de la tumeur. Après la validation du rôle immunosuppresseur des exosomes de CNP, nous avons analysé la fonction des DCs exposées aux exosomes (DCExo) et plus particulièrement leur capacité à activer les cellules T CD3+ totales en co-culture. Afin de caractériser en profondeur les DCExo, nous avons réalisé des analyses phénotypiques, du métabolisme oxydatif ainsi que des analyses de la mécanique fonctionnelle par le dosage des cytokines et par l'étude de l'activité enzymatique de l'indoleamine 2,3-dioxygénase. Nous observons un effet des exosomes tumoraux sur le profil de sécrétion des cytokines, l'activité d'IDO et sur le métabolisme oxydatif des DCs. Enfin, les tests de chimioattraction ont révélé que les exosomes du CNP peuvent recruter les DCExo beaucoup plus efficacement que la chimiokine CCL19. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent fortement que les exosomes de CNP favorisent l'émergence de cellules dendritiques matures régulatrices (mregDC) sécrétant de l'IL-4 et leur recrutement. Ces résultats prometteurs devraient ouvrir de nouvelles perspectives pour des immunothérapies anti-tumorales fondées sur l'inhibition des facteurs impliqués dans l'émergence des cellules régulatrices.

Mots clés : Exosomes, carcinome du nasopharynx, cellules dendritiques matures régulatrices, IL-4, IDO, métabolisme



Nasopharyngeal Carcinoma Exosomes Induce the Emergence of IL-4-secreting Mature Regulatory Dendritic Cells

Journal:	<i>Journal of Extracellular Vesicles</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	LEFEBVRE, Anthony; Univ. Lille, U1189-ONCO-THAI - Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology; INSERM, U1189; CHU Lille TRIOËN, Camille; Univ. Lille, U1189- ONCO-THAI - Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology; INSERM, U1189; CHU Lille RENAUD, Sarah; Univ. Lille, U1189-ONCO-THAI - Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology; INSERM, U1189; CHU Lille LAINE, William; Univ. Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies; CNRS, UMR9020; INSERM, U1277; CHU Lille HENNART, Benjamin; CHU Lille, Laboratoire de toxicologie BOUCHEZ, Clément; Univ. Lille, U1189- ONCOTHAI - Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology; INSERM, U1189; CHU Lille LEROUX, Bertrand; Univ. Lille, U1189- ONCOTHAI - Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology; INSERM, U1189; CHU Lille ALLORGE, Delphine; CHU Lille, Laboratoire de toxicologie KLUZA, Jérôme; Univ. Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies; CNRS, UMR9020; INSERM, U1277; CHU Lille WERKMEISTER, Elizabeth; Univ. Lille, US 41 - UAR 2014 - PLBS; CNRS, UAR 2014; INSERM, US 41; CHU Lille; Institut Pasteur de Lille GROLEZ, Guillaume; Univ. Lille, U1189- ONCOTHAI - Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology; INSERM, U1189; CHU Lille DELHEM, Nadira; Univ. Lille, U1189- ONCO-THAI - Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology; INSERM, U1189; CHU Lille MORALES, Olivier; CNRS, UMR 9020 - ONCOLille; Univ. Lille, U1189- ONCO-THAI - Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology; INSERM, U1189 ; CHU Lille
Abstract:	Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is characterized by an immunosuppressive microenvironment governed by regulatory T cells (Tregs) and tumor exosomes (TEXs). The aim of this study is to evaluate the impact of NPC exosomes on the generation of mature regulatory dendritic cells (mregDCs) that are key players in immune regulation in tumor context contributing to tumor immune escape. After the validation of the immunosuppressive role of NPC exosomes, we analysed the function of exosomes exposed DCs (ExoDCs) and more particularly their capacity to activate total CD3+ T cells in co-culture. In order to deeply characterised ExoDCs, we further performed phenotypic, oxidative metabolic analysis as well as the functional mechanics analysis by

	<p>cytokine dosage and study of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme activity. We observe an effect of tumor exosomes on the cytokines secretion profile, IDO and IL4I1 activity and oxidative metabolism of DCs. Finally, chemoattraction assays revealed that NPC exosomes can recruit ExoDCs much more than CCL19 chemokine. Taken together, our results strongly suggest that NPC exosomes favors the emergence of IL-4 and IL4I1 secreting mature regulatory dendritic cells (mregDCs) and their recruitment. These promising results should open new prospects for anti-tumor immunotherapies based on inhibition of factors involved in the emergence of regulatory cells.</p>
<p>Note: The following files were submitted by the author for peer review, but cannot be converted to PDF. You must view these files (e.g. movies) online.</p>	
<p>Sup Data 3 Migration movie C15ExoDC under C15Exo gradient.mp4 Sup Data 3 Migration movie mDC under C15Exo gradient.mp4 Sup Data 3 Migration movie tDC under C15Exo gradient.mp4</p>	

SCHOLARONE™
Manuscripts

Nasopharyngeal Carcinoma Exosomes Induce the Emergence of IL-4-secreting Mature Regulatory Dendritic Cells

Authors:

Anthony Lefebvre^{1*}, Camille Trioën^{1*}, Sarah Renaud¹, William Laine², Benjamin Hennart³, Clément Bouchez¹, Bertrand Leroux¹, Delphine Allorge³, Jérôme Kluza², Elisabeth Werkmeister⁴, Guillaume Paul Grolez¹, Nadira Delhem^{1*} and Olivier Morales^{1, 2*}

* Equally Contributing Authors

Authors Affiliation:

1. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille U1189 – ONCO-THAI – Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology, F-59000 Lille, France
2. INSERM UMR9020 – UMR-S 1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France
3. CHU Lille, Laboratoire de Toxicologie, F-59000 Lille, France
4. Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 – UAR 2014 – PLBS, F-59000 Lille, France

Corresponding Authors:

Dr Olivier Morales or Pr Nadira Delhem,

ONCOLille Institute

1 rue du Pr Leclerc,

59000 Lille Cedex

Phone : +33 (0) 659598714

Email : olivier.morales@cirs.fr or nadira.delhem@inserm.fr

Financial support:

This research program was partly supported by grant from Canceropôle Nord OUEST Project CNO2019

N. Delhem and O. Morales have received a Grant from the Canceropôle Nord-Ouest. Emerging Project CNO2014.

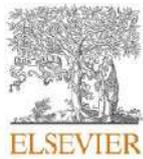
Modulatory effect of rapamycin and tacrolimus on monocyte-derived dendritic cells phenotype and function

Geraldine Dahlqvist^{*}, Sarah Renaud, Clement Barjon, Anthony Lefebvre, Lynda Aoudjehane, Yves Horsmans, Nadira DELHEM^{*}, Filomena Conti^{*}. (*equally contributing authors)

Immunobiology 2021 Jan;226(1):152031.

doi: 10.1016/j.imbio.2020.152031.

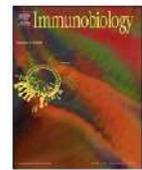
Immunobiology 226 (2021) 152031



Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/imbio



Modulatory effect of rapamycin and tacrolimus on monocyte-derived dendritic cells phenotype and function

Geraldine Dahlqvist^{a,b,*}, Sarah Renaud^{c,d}, Clement Barjon^e, Anthony Lefebvre^c, Lynda Aoudjehane^a, Yves Horsmans^b, Nadira Delhem^{c,d,1}, Filomena Conti^{a,f,1}

^a Sorbonne Université, INSERM, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France

^b Hepatogastroenterology Unit, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium

^c INSERM, CHU-Lille, U1189-ONCO-THAI-Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology, University of Lille, F-59000 Lille, France

^d Immune Insight, Institut de Biologie de Lille, 59021 Lille, France

^e de Duve Institute, UCLouvain, 1200 Brussels, Belgium

^f AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Liver Transplantation Unit, F-75012 Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Tolerance

IDO

Immunosuppressive drugs

ABSTRACT

Background: Immunosuppressive-drugs are needed after solid organ transplantation to prevent allograft rejection but induce severe side effects. Understanding the alloimmune response is critical to modulate it and to achieve graft operational tolerance. The role of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells (Tol-DCs) is undoubtedly essential in tolerance induction. Tacrolimus is considered as the cornerstone of immunosuppression in solid organ transplantation. mTOR inhibitor such as rapamycin are thought to induce tolerance and are used as anticancer drugs in several cancers. The aim of this study was to better understand the effect of these immunosuppressive drugs on the differentiation, maturation and function of human monocyte derived dendritic cells (DCs).

Material and methods: DCs were differentiated from monocytes of healthy donors with either rapamycin (Rapa-DCs) or tacrolimus (Tac-DCs). The phenotype was evaluated by flow cytometry analysis. The production of pro- and anti-inflammatory cytokines was assessed by ELISA. The mRNA expression level of IDO and PD-L1 was assessed by RTqPCR. Mixed leukocytes reactions were performed to analyse suppressive activity of DCs.

Results: Rapa-DC were characterised by a lower expression of the co-stimulatory molecules and CD83 than control-DCs (CTR-DC) ($p < 0.05$). In contrast, tacrolimus had no effect on the expression of surface markers compared to CTR-DCs. Rapamycin reduced both IL-12 and IL-10 secretions ($p < 0.05$). Rapa-DCs had a suppressive effect on CD4⁺ allogenic T cells compared to CTR-DCs ($p < 0.05$). However, neither Rapa-DCs nor Tac-DCs favoured the emergence of a CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ population compared to CTR-DCs. Surprisingly, Rapa-DCs had a reduced expression of IDO and PD-L1 compared to Tac-DCs and CTR-DCs.

Conclusion: Rapa-DCs exhibit an incomplete phenotypic tolerogenic profile. To our knowledge this is the first paper showing a reduction of expression of pro-tolerogenic enzyme IDO in DCs. Tacrolimus does not change the phenotypical or functional characteristics of moDCs.

Modulatory effect of rapamycin and tacrolimus on monocyte-derived dendritic cells phenotype and function

Geraldine Dahlqvist*, Sarah Renaud, Clement Barjon, Anthony Lefebvre, Lynda Aoudjehane, Yves Horsmans, Nadira DELHEM*, Filomena Conti*. (*equally contributing authors)

Résumé :

Contexte : Les médicaments immunosuppresseurs sont nécessaires après une transplantation d'organe solide pour prévenir le rejet de l'allogreffe, mais ils induisent de graves effets secondaires. Il est essentiel de comprendre la réponse allo-immune pour la moduler et obtenir une tolérance opérationnelle du greffon. Le rôle des cellules T régulatrices et des cellules dendritiques tolérogènes (Tol-DC) est sans aucun doute essentiel dans l'induction de la tolérance. Le tacrolimus est considéré comme la pierre angulaire de l'immunosuppression dans la transplantation d'organes solides. Les inhibiteurs mTOR tels que la rapamycine sont censés induire la tolérance et sont utilisés comme médicaments anticancéreux dans plusieurs cancers. L'objectif de cette étude était de mieux comprendre l'effet de ces médicaments immunosuppresseurs sur la différenciation, la maturation et la fonction des cellules dendritiques (DC) dérivées de monocytes humains.

Matériel et méthodes : Les DCs ont été différenciées à partir de monocytes de donneurs sains avec de la rapamycine (Rapa-DC) ou du tacrolimus (Tac-DC). Le phénotype a été évalué par analyse en cytométrie de flux. La production de cytokines pro- et anti-inflammatoires a été évaluée par ELISA. Le niveau d'expression de l'ARNm d'IDO et de PD-L1 a été évalué par RTqPCR. Des réactions mixtes de leucocytes ont été réalisées pour analyser l'activité suppressive des DC.

Résultats : Les Rapa-DC étaient caractérisées par une plus faible expression des molécules co-stimulatrices et de CD83 que les DC contrôles (CTR-DC) ($p < 0,05$). En revanche, le tacrolimus n'a eu aucun effet sur l'expression des marqueurs de surface par rapport aux CTR-DC. La rapamycine a réduit les sécrétions d'IL-12 et d'IL-10 ($p < 0,05$). Les Rapa-DC ont eu un effet suppressif sur les cellules T allogéniques CD4+ par rapport aux CTR-DC ($p < 0,05$). Cependant, ni les Rapa-DC ni les Tac-DC n'ont favorisé l'émergence d'une population CD4+CD25^{high}Foxp3⁺ par rapport aux CTR-DCs. De manière surprenante, les Rapa-DC avaient une expression réduite d'IDO et de PD-L1 par rapport aux Tac-DC et aux CTR-DC.

Conclusion : Les Rapa-DC présentent un profil phénotypique tolérogène incomplet. A notre connaissance, il s'agit du premier article montrant une réduction de l'expression de l'enzyme pro-tolérogène IDO dans les DC. Le tacrolimus ne modifie pas les caractéristiques phénotypiques ou fonctionnelles des DC.

Mots clés : IDO ; Médicaments immunosuppresseurs ; Tolérance.

Novel Therapies Boosting T Cell Immunity in Epstein Barr Virus-Associated Nasopharyngeal Carcinoma

Sarah Renaud, Anthony Lefebvre, Serge Mordon, Olivier Moralès and Nadira Delhem

International Journal of Molecular Sciences. Juin 2020; 21(12).4292.

doi : [10.3390/ijms21124292](https://doi.org/10.3390/ijms21124292)



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Novel Therapies Boosting T Cell Immunity in Epstein Barr Virus-Associated Nasopharyngeal Carcinoma

Sarah Renaud ^{1,2} , Anthony Lefebvre ¹, Serge Mordon ¹ , Olivier Moralès ^{1,*}  and Nadira Delhem ^{1,*}

¹ INSERM, CHU-Lille, U1189—ONCO-THAI—Assisted Laser Therapy and Immunotherapy for Oncology—ImmunoPDT and Immunotherapy of Cancer Department, University of Lille, F-59000 Lille, France; sarah.renaud@immune-insight.com (S.R.); anthony.lefebvre@ibl.cnrs.fr (A.L.); serge.mordon@inserm.fr (S.M.)

² Immune insighT, Institut de Biologie de Lille, 59021 Lille, France

* Correspondence: olivier.morales@ibl.cnrs.fr (O.M.); nadira.delhem@ibl.cnrs.fr (N.D.); Tel.: +33-3208-71251 (O.M.); +33-3208-71253 (N.D.); Fax: +33-32087-1019 (O.M. & N.D.)

Received: 23 April 2020; Accepted: 12 June 2020; Published: 16 June 2020



Abstract: Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a malignant tumour of the head and neck affecting localised regions of the world, with the highest rates described in Southeast Asia, Northern Africa, and Greenland. Its high morbidity rate is linked to both late-stage diagnosis and unresponsiveness to conventional anti-cancer treatments. Multiple aetiological factors have been described including environmental factors, genetics, and viral factors (Epstein Barr Virus, EBV), making NPC treatment that much more complex. The most common forms of NPCs are those that originate from the epithelial tissue lining the nasopharynx and are often linked to EBV infection. Indeed, they represent 75–95% of NPCs in the low-risk populations and almost 100% of NPCs in high-risk populations. Although conventional surgery has been improved with nasopharyngectomy's being carried out using more sophisticated surgical equipment for better tumour resection, recent findings in the tumour microenvironment have led to novel treatment options including immunotherapies and photodynamic therapy, able to target the tumour and improve the immune system. This review provides an update on the disease's aetiology and the future of NPC treatments with a focus on therapies activating T cell immunity.

Keywords: therapy; T cell; immunity; EBV; nasopharyngeal carcinoma

Novel Therapies Boosting T Cell Immunity in Epstein Barr Virus-Associated Nasopharyngeal Carcinoma

Sarah Renaud, **Anthony Lefebvre**, Serge Mordon, Olivier Moralès and Nadira Delhem

Résumé :

Le carcinome du nasopharynx (CNP) est une tumeur maligne de la tête et du cou qui touche des régions localisées du monde, les taux les plus élevés étant décrits en Asie du Sud-Est, en Afrique du Nord et au Groenland. Son taux de morbidité élevé est lié à la fois au diagnostic tardif et à la non-réponse aux traitements anticancéreux conventionnels. De multiples facteurs étiologiques ont été décrits, notamment des facteurs environnementaux, génétiques et viraux (virus d'Epstein Barr, EBV), ce qui rend le traitement des CNP d'autant plus complexe. Les formes les plus courantes de CNP sont celles qui proviennent du tissu épithélial tapissant le nasopharynx et sont souvent liées à une infection par le virus EBV. En effet, elles représentent 75 à 95 % des CNP dans les populations à faible risque et près de 100 % des CNP dans les populations à haut risque. Bien que la chirurgie conventionnelle ait été améliorée, les nasopharyngectomies étant réalisées à l'aide d'un équipement chirurgical plus sophistiqué pour une meilleure résection de la tumeur, les récentes découvertes sur le microenvironnement tumoral ont conduit à de nouvelles options thérapeutiques, notamment les immunothérapies et la thérapie photodynamique, capables de cibler la tumeur et d'améliorer le système immunitaire. Cette revue fait le point sur l'étiologie de la maladie et l'avenir des traitements du CNP en mettant l'accent sur les thérapies activant l'immunité des cellules T.

Mots clés : thérapie, cellule T, immunité, EBV, carcinome du nasopharynx

Mini Review: Exosomes from discovery to Isolation

Sarah Renaud, Anthony Lefebvre, Olivier Moralès and Nadira Delhem

International Journal of Molecular Sciences. Juin 2020; 21(12).4292.

doi : [10.3390/ijms21124292](https://doi.org/10.3390/ijms21124292)

Mini Review



ISSN: 2574 -1241

DOI: 10.26717/BJSTR.2019.15.002683

Mini Review: Exosomes from Discovery to Isolation

Sarah Renaud, Anthony Lefebvre, Olivier Moralès* and Nadira Delhem

CNRS UMR 8161 Equipe IRCV, Institut Pasteur de Lille, France

*Corresponding author: Olivier Moralès, CNRS UMR 8161 équipe IRCV, Institut Pasteur de Lille, France



ARTICLE INFO

Received: February 18, 2019

Published: February 28, 2019

Citation: Sarah Renaud, Anthony Lefebvre, Olivier Moralès, Nadira Delhem. Mini Review: Exosomes from Discovery to Isolation. Biomed J Sci & Tech Res 15(2)-2019. BJSTR. MS.ID.002683.

ABSTRACT

Since their discovery more than two decades ago, it has become increasingly clear that exosomes play a crucial role in bodily homeostasis. In this mini-review we give an update on exosome biogenesis, functions and compare isolation techniques based on previous reports.

Keywords: Exosomes; Exosome Discovery; Exosome Isolation; Exosomes and Immunity; Extracellular Vesicles

Résumé :

Depuis leur découverte il y a plus de deux décennies, il est de plus en plus évident que les exosomes jouent un rôle crucial dans l'homéostasie corporelle. Dans cette mini-revue, nous faisons le point sur la biogénèse et les fonctions des exosomes et comparons les techniques d'isolement sur la base de rapports antérieurs.

Mots clés : Exosomes ; découverte des exosomes ; isolement des exosomes ; exosomes et immunité ; vésicules extracellulaires.

Abstract of the thesis

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is an upper aerodigestive tract tumor associated with Epstein-Barr virus (EBV) infection. NPC is characterized by an immunosuppressive microenvironment that promotes tumor immune escape. Two major actors with immunosuppressive properties have been described, regulatory T cells (Treg) and NPC tumor exosomes (NPCExo). Recently, our team has shown that NPCExo promote the suppressive function of Treg as well as their recruitment via the chemokine CCL20. In this context, the objective of this thesis was to evaluate the ability of NPCExo to induce the emergence of tolerogenic dendritic cells (tDC), which are known to promote tumor development by inhibiting the T cell response.

The results obtained show that NPCExo promote the generation of tolerogenic mature regulatory DCs (mregDC). Indeed, DCs generated in the presence of NPCExo (NPCExoDC) have a defect in LT activation in co-culture compared to mature DCs (mDC). This defect is not related to a change in the phenotype of these cells since it is comparable to that of mDC. On the other hand, during their development we notice changes in their cytokine production. During the differentiation phase, NPCExoDC show an important activity of the IDO enzyme and a secretion of the immunosuppressive cytokine IL-10. Then, during the maturation phase, these NPCExoDC produce very little of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-12 in connection with a significant production of IL-4 regulating the production of IL-12. Interestingly, we observed a decrease in oxidative metabolism compared to mDCs which may be related to a decrease in effector capacity. In parallel, we studied the effect of exosomes from NPC patients (NPCpatientSEV) and we also observed the emergence of mature DCs with a defect in pro-inflammatory cytokine production and LT activation.

Then, in order to study the migration capacities of DCs generated with NPCExo, we studied their potential attraction by known chemokines such as CCL19 or CCL20 as well as for NPCExo. Our results show that mregDCs are attracted to NPCExo to a greater extent than to the chemokine CCL19. On the other hand, the attraction by NPCExo does not seem to be dependent on CCL20 as it was the case for the attraction of Treg previously demonstrated in the laboratory.

Finally, to identify exosomal players responsible for DC functional modifications, we studied the role of galectin-9 (Gal-9). Gal-9 does not alter the phenotype and cytokine secretion of DCs compared to mDCs but appears to activate LTs less efficiently in co-culture compared to mDC-induced LT activation. Finally, interestingly, the addition of a Gal-9 blocking antibody, 1g3 (patented by our laboratory) seems to restore the activating capacities of DC on LT, confirming the role of this molecule.

All our results open interesting avenues not only in the understanding of the pathophysiology of NPC but also new therapeutic perspectives via targeting tumor exosomes.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma, extracellular vesicles, exosomes, mature regulatory dendritic cells (mregDC), IL-4

Résumé

Le carcinome du nasopharynx (CNP) est une tumeur des voies aérodigestives supérieures associée à une infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV). Le CNP est caractérisé par un microenvironnement immunitaire immunosuppresseur favorisant l'échappement de la tumeur à la réponse immune. Deux acteurs majeurs aux propriétés immunosuppressives ont été décrits, les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les exosomes tumoraux de CNP (ExoCNP). Récemment, notre équipe a montré que les ExoCNP favorisent la fonction suppressive des Treg ainsi que leur recrutement *via* la chimiokine CCL20. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été d'évaluer les capacités des ExoCNP à induire également l'émergence de cellules dendritiques (DC) tolérogènes (tDC), connues pour favoriser le développement tumoral par l'inhibition de la réponse des lymphocytes T.

Les résultats obtenus montrent que les ExoCNP favorisent la génération de DC matures régulatrices (mregDC) tolérogènes. En effet, les DC générés en présence d'ExoCNP (DCExoCNP) possèdent un défaut d'activation des LT en co-culture en comparaison avec des DC matures (mDC). Ce défaut n'est pas relié à un changement dans le phénotype de ces cellules puisqu'il est comparable à celui des mDC. En revanche, lors de leur développement nous remarquons des changements dans leur production de cytokines. Lors de la phase de différenciation les DCExoCNP présentent une activité importante de l'enzyme IDO ainsi qu'une sécrétion de la cytokine immunosuppressive l'IL-10. Ensuite, lors de la phase de maturation ces DCExoCNP ne produisent que très peu les cytokines proinflammatoires IL-6 et IL-12 en lien avec une production importante d'IL-4 régulant la production d'IL-12. De façon intéressante, nous avons observé une diminution du métabolisme oxydatif par rapport aux mDC pouvant être en lien avec une diminution des capacités effectrices. Parallèlement nous avons étudié l'effet d'exosomes de patients atteints de CNP (SEVPatientCNP) et nous observons également l'émergence de DC matures ayant un défaut de production de cytokines pro-inflammatoire et d'activation des LT.

Par la suite, dans le but d'étudier les capacités de migration des DC générées avec les ExoCNP, nous avons étudié leur potentielle attraction par des chimiokines connues telles que la CCL19 ou la CCL20 ainsi que pour les ExoCNP. Nos résultats montrent que les mregDC sont attirées par les ExoCNP et ce de façon plus importante en comparaison à la chimiokine CCL19. En revanche, l'attraction par les ExoCNP ne semble pas dépendant de la CCL20 comme c'était le cas pour l'attraction des Treg précédemment démontré au laboratoire.

Enfin, pour identifier des acteurs exosomaux responsables des modifications fonctionnelles des DC, nous avons étudié le rôle de la galectine-9 (Gal-9). La Gal-9 ne modifie pas le phénotype et la sécrétion de cytokines par les DC en comparaison aux mDC mais semblent activer, de manière moins efficace, les LT lors d'une co-culture comparativement à l'activation des LT induites par les mDC. Enfin, de façon intéressante, l'ajout d'un anticorps bloquant la Gal-9, l'Ig3 (breveté par notre laboratoire) semble restaurer les capacités activatrices des DC sur les LT, confirmant le rôle de cette molécule.

L'ensemble de nos résultats entrouvrent ainsi des voies intéressantes, non seulement dans la compréhension de la physiopathologie du CNP, mais également de nouvelles perspectives thérapeutiques via un ciblage des exosomes tumoraux.

Mots clés : Carcinome du Nasopharynx, vésicule extracellulaire, exosomes, cellules dendritiques matures régulatrices (mregDC), IL-4