



**HAL**  
open science

# L'absence de CD226 caractérise des LT CD8+ hyporépondeurs au TCR et aux fonctions antitumorales défectueuses

Marianne Weulersse

► **To cite this version:**

Marianne Weulersse. L'absence de CD226 caractérise des LT CD8+ hyporépondeurs au TCR et aux fonctions antitumorales défectueuses. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30174 . tel-02948443

**HAL Id: tel-02948443**

**<https://theses.hal.science/tel-02948443v1>**

Submitted on 24 Sep 2020

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

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



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par : *l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*

---

---

Présentée et soutenue le *24 octobre 2019* par :

**MARIANNE WEULERSSE**

**L'absence de CD226 caractérise des LT CD8<sup>+</sup> hyporépondeurs au TCR  
et aux fonctions antitumorales défectueuses**

---

---

## JURY

MAHA AYYOUB

ERIC TARTOUR

JEAN-PIERRE COUTY

CHRISTOPHE PAGET

SALVATORE VALITUTTI

LUDOVIC MARTINET

PU-PH, Université Toulouse III

PU-PH, DR INSERM, PARCC

MCU, Université Paris VII

CR INSERM, CEPR Tours

DR INSERM, CRCT Toulouse

CR INSERM, CRCT Toulouse

Présidente du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

---

**École doctorale et spécialité :**

*BSB : Immunologie*

**Unité de Recherche :**

*Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (INSERM UMR 1037, Équipe 13)*

**Directeur de Thèse :**

*Ludovic MARTINET*

**Rapporteurs :**

*Eric TARTOUR, Jean-Pierre COUTY et Christophe PAGET*

## *Remerciements*

Je tenais tout d'abord à remercier Ludovic de m'avoir « choisie » comme sa première étudiante en thèse au sein de l'équipe 13 du CRCT créée depuis peu. Relativement novice en immunologie, je me rappelle être arrivée dans l'équipe avec une grande ambition et une envie d'apprendre, beaucoup. Même si peu de personnes constituaient l'équipe à cette époque, leur gentillesse et leur accueil m'ont permis de vite m'intégrer et de m'y sentir très bien. Donc merci Ludo, d'avoir su m'intégrer au sein de ton équipe et de m'avoir transmis une (infime !) partie de tes connaissances en immunologie, parce que c'est vrai que tu en sais beaucoup ! Merci aussi pour ta disponibilité et tes conseils au cours de mes quatre années de thèse.

J'en viens donc à remercier tous les membres de l'équipe 13. Andréa, ma poulette, avec qui j'ai commencé ma thèse lorsqu'elle était en Master ; je me rappellerai toujours du luxe de notre premier grand bureau à l'hôpital, je pense que nous n'aurons plus jamais la chance de travailler dans un si grand espace ! C'est à ce moment-là que j'ai découvert que tu avais quelques problèmes avec la langue française...J'espère que j'ai en partie contribué à ta culture et à ta maîtrise de toutes les expressions (même si tu as toujours quelques problèmes avec certaines !) Merci pour ta bonne humeur permanente, tes attentions culinaires (quelque fois ratées) qui font toujours du bien. Tu es ambitieuse et motivée, je suis sûre que tu seras une grande chercheuse dans les prochaines années ! Je te souhaite plein de courage pour la suite, future docteure Pichler.

Marie-V, parce que personne ni elle, n'aime l'appeler Marie-Véronique ! Je me souviens qu'au début de ma thèse tu me considérais comme ta stagiaire... Mais oui, c'est vrai j'ai beaucoup appris grâce à toi et je suis ravie qu'on ait pu travailler ensemble sur ce projet CD226. Même si la route était longue pour parvenir à des résultats probants, nous y sommes arrivées ! Merci ma petite Marie, pour ta gentillesse, ton attention, tes bons conseils de lecture et de cinéma.

Nadège, considérée comme « maman » de l'équipe, qui veille sur tout le monde et contribue à apaiser les tensions qu'il peut y avoir de temps en temps au labo. Merci donc Nadège d'avoir su rester attentive au long de ces quatre années, notamment dans les moments difficiles de la dernière ligne droite. Merci pour ta disponibilité du lundi matin quand tu venais me chercher à l'aéroport après mes weekends parisiens, tu es vraiment gentille. Je garderai aussi le souvenir de ta capacité à rendre les déjeuners à la cantine bien sympas et très animés, à crier tout aussi bien que Bettina dans les couloirs pour que ce soit à nous de nous déplacer dans ton bureau, et enfin à ton envie d'aller voir les autres et de faire la fête dès que tu en as l'occasion !

Tchoupie, la petite (et c'est le cas de le dire !) dernière recrue de l'équipe. Merci pour ta bonne humeur et ton caractère qui pimentent souvent les discussions et les débats ! Surtout ne change pas, c'est bien d'être comme ça. Merci Tchoupie pour ton sourire quotidien et ta bonne humeur au labo, reste comme tu es !

Sahar, merci pour tes conseils précieux, ton soutien, ta générosité et ta douceur. C'est vrai, j'ai toujours trouvé que tu étais une personne apaisante, aussi bien pour le son de ta voix ou ta façon de marcher. Ça fait du bien d'être entourée de gens comme toi, surtout dans un labo dirigé par quelqu'un d'assez speed ! Merci aussi pour tes bons gâteaux libanais qui sont probablement les meilleurs que je n'ai jamais mangés ! Sahar, je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille, et une belle continuation dans le monde de la recherche.

Ma petite Léa, la plus gentille fille au monde. Qui n'aime pas et évite les conflits, qui ne critique jamais personne, c'est tellement agréable... et rare ! Donc merci Léa pour ta gentillesse, tes si bons cookies, tes bonbons que tu me donnais en fin de journée quand j'avais besoin de sucre ! J'oubliais : je me souviendrai toujours de ton énorme capacité d'anticipation de matériels au labo, c'est sûr qu'avec toi on ne risque pas de manquer de quoi que ce soit pour nos manips ! J'espère vraiment que tu trouveras le post-doc de tes rêves en Australie, tu le mérites.

Enfin, Assia ma sauveuse ! Quel bonheur d'avoir travaillé et échangé avec toi pendant cette dernière année, tu as su insuffler un nouvel élan au projet qui n'a fait que l'enrichir. Je sais que grâce à toi, nous avons pu avoir toutes les cartes en main pour faire un beau papier qui je l'espère sera publié prochainement. Merci ma belle Assia de t'être si bien occupée de moi, de m'avoir appris beaucoup de choses, tant au niveau scientifique que personnel. Merci de m'avoir nourrie avec toutes tes petites gourmandises que tu sais apprécier (plus ?) que moi ! J'espère que tu continueras à transmettre ta bonne humeur et tes connaissances aux gens qui t'entourent, tu le fais si bien. Je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur dans tout ce que tu décideras d'entreprendre, et surtout continues tes sketches !

Un grand merci aussi à « l'autre partie » de l'équipe, que nous avons décidé de laisser seule à l'hôpital pour nous rapprocher des « vrais » chercheurs : Sabrina, Laure et Laura je suis vraiment contente de vous connaître. Sabrina, même si tes remarques sont parfois maladroites, tu es quand même bien drôle, donc merci pour ta bonne humeur et tes bonnes blagues quotidiennes. Laure, la gentille et douce Laure. Merci Laure pour ta gentillesse et ton regard bienveillant. Laura, enfin ! Ma petite Laura qui désespère seule dans son bureau de l'hôpital ... j'espère qu'on est parvenu à te changer un peu les idées quand on venait te voir dans ton antre. Merci Laura pour ta disponibilité, ta réactivité pour répondre à mes (futiles) questions de mathématiques et de statistiques, et bien sûr pour ta gentillesse inégalable ! J'ai aussi une petite pensée pour Christophe, j'ai passé de très moments avec toi à parler de certaines choses que nous avons en commun. Ces petits moments en dehors du monde de ma thèse m'ont fait beaucoup de bien, donc merci.

Mes amis du 4<sup>ème</sup> étage, notamment Laura, Max, Rita, Jojo Lapin, Tony, Erick, Jeremy, Joey et Vincent. Quel bonheur de vous avoir rencontrés après le déménagement de notre équipe dans les locaux du CRCT. Bien que vos grandes et fréquentes pauses café m'ont donné l'impression d'une équipe assez relax, elles m'ont quand même permis d'apprendre à vous connaître et à vous aimer ! Je pourrai écrire beaucoup de choses dans ces remerciements, pour chacun d'entre vous mais ce serait trop long ; je vais essayer d'aller à l'essentiel.

Laura, mon amie et ma confidente de toujours depuis mon arrivée à Toulouse. Merci pour ton écoute et tes bons conseils, merci d'être là et d'être toi. Ton sérieux et ta rigueur au travail m'étonneront toujours, je sais que ça va finir par payer et que parviendras un jour à diriger ton propre labo ! Merci pour ces moments entre filles, tes petites attentions, de faire en sorte que ce soit toujours aussi simple et agréable de vous recevoir tous à Creysse ( tu connais presque la maison aussi bien que moi), d'être toujours partante pour aller suer un peu dans les Pyrénées. Vivement nos vacances au Costa-Rica !

Max, jojo, Rita et Jeremy merci pour ces bons moments que nous avons passés ensemble, aussi bien au labo qu'ailleurs, notamment à Creysse et à Arcachon. Je garderai un souvenir mémorable de tout ça, et j'espère que ces rencontres ne sont que le début d'une longue et belle amitié. Merci pour votre écoute, votre disponibilité, vos blagues et votre simplicité, que je considère comme une des plus belles qualités humaines. Tony, même si l'on ne s'est pas vu beaucoup au CRCT je sais que je peux compter sur toi pour aller prendre un verre ou aller au resto ! Merci donc d'être toujours partant pour faire quelque chose, et d'avoir été aussi généreux pour nos nombreuses soirées chez toi. Erick, merci mon ami d'avoir été là, de m'avoir écoutée et comprise, d'être toujours disponible pour une balade et faire la fête, merci pour tes belles valeurs que j'admire. Bravo aussi pour ton courage et ta persévérance, je sais que ça n'a pas toujours été facile d'être loin de sa famille et de son pays. Joey, le petit jeune de la bande, j'adore, ta bonne humeur, ta simplicité, ta gentillesse, je dois dire que je ne te connais pas beaucoup de défauts ! Je suis vraiment contente de te connaître, et espère qu'on continuera à passer de bons moments ensemble, à Lyon ou ailleurs ! Vincent, ton calme et ta sérénité m'ont fait chaque jour beaucoup de bien (mais surtout tes bonnes bières lorraines !), merci beaucoup !

Last but not least, merci à ma bande de marie-curiens, ma deuxième famille qui est et sera je l'espère toujours là pour moi. Même s'il a été difficile de se voir aussi souvent qu'avant, on a toujours trouvé l'occasion de s'appeler et de se retrouver. Ces moments ressourçants sont tellement importants, et j'en profite à chaque instant. Merci les copains d'être toujours présents, de m'avoir soutenue et encouragée pendant ma thèse.

Enfin, je remercie du fond du cœur ma famille : maman, papa, So et Ju (plus les beaux-frères, Jean et Flo). Vous savez bien que c'est grâce à vous si j'en suis arrivée ici aujourd'hui, votre amour et votre soutien me rendent plus forte chaque jour. Merci maman et papa, de m'avoir rendu la vie si facile quand j'en avais le plus besoin, merci pour votre attention et votre écoute (presque) quotidienne et vos conseils qui sont et resteront les meilleurs du monde. Les filles, heureusement que vous êtes là, pour m'encourager, me faire rire et relativiser parce que comme papa le dit si bien, dans la vie il n'y a qu'une seule chose qui compte, c'est l'amour ! Merci à Jean et à Flo pour leur gentillesse et leur présence qui nous font tellement de bien à tous. La famille, je vous aime.



# Sommaire

<b>Objectifs et résumé des travaux de thèse.....</b>	<b>5</b>
<b>Table des abréviations.....</b>	<b>7</b>
<b>Table des illustrations.....</b>	<b>11</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>14</b>
A. L'immunosurveillance antitumorale.....	14
1. Rappel historique.....	14
2. L'immunoediting.....	15
3. Les lymphocytes cytotoxiques T CD8 <sup>+</sup> .....	18
a) Reconnaissance des tumeurs par les LT CD8 <sup>+</sup> .....	18
b) Rôle des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> dans l'immunosurveillance.....	21
c) Valeur pronostique des LT CD8 <sup>+</sup> dans les cancers.....	22
B. Activation et différenciation des LT CD8 <sup>+</sup> cytotoxiques.....	24
1. La reconnaissance spécifique de l'antigène peptidique.....	24
2. Activation des LT CD8 <sup>+</sup> antitumoraux.....	25
a) Présentation de l'antigène tumoral dans les ganglions lymphatiques.....	25
b) Activation et voie de signalisation du TCR.....	29
c) Les récepteurs coactivateurs des LT CD8 <sup>+</sup> .....	31
(1) CD28.....	32
(2) ICOS.....	35
(3) CD137.....	35
(4) GITR et OX40.....	42
3. Fonctions effectrices des LT CD8 <sup>+</sup> .....	45
a) Fonctions cytotoxiques.....	45
(1) La voie de mort par exocytose.....	45
(2) La voie de mort par les récepteurs de mort.....	47
b) Sécrétion de cytokines.....	48
(1) L'IFN- $\gamma$ .....	48
(2) Le TNF- $\alpha$ .....	50
4. Génération des LT CD8 <sup>+</sup> effecteurs et des LT CD8 <sup>+</sup> mémoires.....	51
a) Sous-types de LT CD8 <sup>+</sup> mémoires.....	51

b)	Rôle antitumoral des différentes populations mémoires .....	53
c)	Facteurs impliqués dans la différenciation des LT CD8 <sup>+</sup> effecteurs .....	56
(1)	Les médiateurs cellulaires et les cytokines .....	56
(2)	Facteurs de transcription .....	57
<b>C.</b>	<b>Epuisement lymphocytaire et immunothérapies.....</b>	<b>60</b>
1.	Les récepteurs inhibiteurs des LT CD8 <sup>+</sup> .....	60
a)	CTLA-4 .....	60
(1)	Structure, expression et voie de signalisation.....	60
(2)	Fonctions de CTLA-4.....	62
(3)	Immunothérapies anti-CTLA-4 .....	64
b)	PD-1 .....	65
(1)	Structure, expression et voie de signalisation.....	65
(2)	Fonctions de PD-1.....	66
(3)	Immunothérapies anti-PD1 .....	70
(4)	Les bithérapies.....	71
2.	L'épuisement lymphocytaire .....	75
a)	Phénotype et fonctions des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> épuisés .....	75
b)	Réponse aux immunothérapies anti-PD1 .....	78
<b>D.</b>	<b>Les récepteurs aux nectines et aux « nectine-like ».....</b>	<b>81</b>
1.	Les nectines et les « nectine-like » .....	81
2.	Signalisation du récepteur CD226.....	83
3.	Rôles de CD226 dans les fonctions des cellules NK.....	88
a)	Activation des fonctions effectrices .....	89
b)	Rôle de CD226 dans « l'éducation » des cellules NK.....	90
c)	CD226 identifie deux populations de cellules NK aux fonctions différentes .....	92
d)	Rôle de CD226 dans la régulation des fonctions des cellules dendritiques .....	94
4.	Rôle de CD226 dans les fonctions des lymphocytes T .....	95
a)	Rôle de CD226 dans les fonctions effectrices des LT CD8 <sup>+</sup> .....	96
b)	Rôle de CD226 dans les fonctions effectrices des LT CD4 <sup>+</sup> .....	97
5.	Rôle de CD226 dans l'immunosurveillance.....	100
a)	Rôle dans l'immunosurveillance antitumorale.....	100
(1)	Evidences expérimentales sur des modèles murins.....	100
(2)	Rôle pronostic de l'expression de CD155 dans les tumeurs .....	104
b)	Rôle de CD226 dans l'auto-immunité.....	105



6. Les récepteurs négatifs de CD226 .....	106
a) TIGIT.....	106
(1) Expression, structure et voie de signalisation.....	106
(2) Fonctions .....	108
(3) Rôle de TIGIT dans le cancer .....	112
b) CD96 .....	114
(1) Structure, profil d'expression et voie de signalisation.....	114
(2) Rôles de CD96.....	115
<b>II. RESULTATS .....</b>	<b>118</b>
<b>III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>165</b>
A. Rôle de CD226 dans l'activation des LT CD8 <sup>+</sup> .....	166
1. Le récepteur CD226 : marqueur phénotypique ou fonctionnel .....	166
2. CD226 est nécessaire à la transduction du signal TCR des LT CD8 <sup>+</sup> .....	167
3. CD226 est nécessaire au changement conformationnel de LFA-1.....	169
4. CD226 pourrait agir indépendamment de ses ligands .....	171
B. Rôle de CD226 dans le microenvironnement tumoral .....	172
1. Le microenvironnement tumoral génère des LT CD8 <sup>+</sup> CD226 <sup>-</sup> hypofonctionnels .	172
2. Mécanismes impliqués dans la downmodulation de CD226.....	174
a) Le facteur de transcription Eomes.....	174
b) Le récepteur coactivateur CD137.....	176
C. CD226 comme biomarqueur de réponses aux immunothérapies .....	177
<b>IV. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>182</b>
<b>V. ANNEXES.....</b>	<b>219</b>

# Objectifs de la thèse et résumé des travaux

Les lymphocytes cytotoxiques T CD8<sup>+</sup> (LT CD8<sup>+</sup>) sont des cellules de l'immunité adaptative qui jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires antitumorales via leurs capacités à reconnaître et tuer spécifiquement les cellules cancéreuses. A la suite de la reconnaissance entre leur TCR et le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) /peptide exprimé par les cellules cibles, les LT CD8<sup>+</sup> sécrètent des cytokines effectrices et des granules cytolytiques qui conduisent à l'apoptose de la cellule tumorale. Bien que l'activation des LT CD8<sup>+</sup> résulte principalement de cette interaction, des récepteurs membranaires coactivateurs et coinhibiteurs régulent finement leurs fonctions. Les récepteurs inhibiteurs des LT CD8<sup>+</sup> PD-1 et CTLA-4 représentent actuellement les cibles majeures des traitements immunothérapeutiques contre le cancer. L'Ipilimumab (anti-CTLA-4) est utilisé dans le traitement de mélanome avancé, tandis que les anti-PD-1 ( Nivolumab et Pembrolizumab) sont utilisés dans le traitement de nombreux autres types de cancer (cancinomes urothéliaux et rénaux, mélanome, du cancer bronchique non à petites cellules et du lymphome). Malgré l'efficacité des immunothérapies dans l'amélioration de la survie de nombreux patients, elles ne parviennent pas à éradiquer la totalité des cellules tumorales et plusieurs types de cancers y sont insensibles. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles régulant les fonctions antitumorales des LT CD8<sup>+</sup> est un enjeu majeur dans la recherche et le développement de traitements anti-cancéreux. CD226 est un récepteur activateur des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et des cellules NK. Il interagit avec ses ligands CD112 et CD155 fréquemment exprimés par les cellules tumorales pour augmenter leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et leur production de granules cytotoxiques qui conduisent à l'apoptose de la cellule tumorale. De nombreux modèles précliniques de cancers solides et hématopoïétiques ainsi que des analyses réalisées *ex-vivo* sur des cellules de patients ont démontré le rôle majeur de CD226 dans l'immunosurveillance antitumorale. Au vu du rôle de CD226 dans l'augmentation des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, la caractérisation de son expression au sein de LT CD8<sup>+</sup> circulants d'individus sains nous a conduit à identifier deux populations distinctes de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>.

Mes travaux ont donc initialement consisté à caractériser les propriétés fonctionnelles de ces deux populations lymphocytaires chez les individus sains. Nous avons démontré que l'absence de CD226 conduit à un état d'hyporéponse majeur des LT CD8<sup>+</sup> vis-à-vis de la stimulation du TCR. Contrairement aux LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>, les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> ne prolifèrent pas, sécrètent de faibles quantités de cytokines pro-inflammatoires et ont des capacités cytolytiques altérées vis-à-vis de cibles tumorales. Des analyses transcriptomiques et fonctionnelles ont confirmé le rôle majeur de CD226 dans l'acquisition d'un programme d'activation des LT CD8<sup>+</sup> stimulés par le TCR.

Le deuxième objectif de ma thèse a été d'identifier et de caractériser les populations lymphocytaires CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> dans un contexte tumoral, à la fois chez des patients atteints de cancer et dans des modèles murins précliniques. Chez des patients atteints de cancer (myélome multiple et cancer de l'ovaire) et dans des modèles murins de mélanome (B16F10) et de myélome multiple (MM), l'absence de CD226 caractérise une population de LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux aux faibles capacités prolifératives et aux fonctions effectrices altérées en réponse au TCR, dont la proportion est corrélée à la croissance tumorale chez la souris.

Le troisième objectif de ma thèse a été de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine du développement des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>. Nous avons donc mis en évidence que l'accumulation progressive des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> hypofonctionnels chez des souris porteuses de tumeurs dépend de l'expression d'Eomes. Les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles semblent indiquer que l'absence de CD226 constitue un nouveau marqueur de LT CD8<sup>+</sup> « épuisés ». De façon importante, nous avons démontré que l'expression de CD226 est requise pour l'efficacité de la réponse aux immunothérapies anti-PD-1 dans des modèles murins de tumeurs solides (mélanome B16K1 et carcinome du côlon MC38), ce qui tend à suggérer que l'absence de CD226 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> est impliquée dans la résistance à l'immunothérapie chez des patients réfractaires. En conclusion, nos travaux indiquent que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> sont des LT CD8<sup>+</sup> hyporépondeurs au signal TCR et qu'ils possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles similaires à celles des LT CD8<sup>+</sup> épuisés dans le cancer. On suppose donc que CD226 est un récepteur qui constitue un marqueur prédictif de la réponse aux traitements anti-PD-1 chez les patients atteints de cancer et être une cible majeure dans les futures stratégies immunothérapeutiques.



# Table des abréviations

## A

**AP-1:** Activation protein-1

**ATM:** Ataxia *Telangiectasia Mutated*

**ATR:** ATM- and Rad3-related

## B

**BAGE :** Bladder antigen

**Bcl2:** B-cell lymphoma 2

**Bcl-6:** B-cell Lymphoma 6

**Blimp-1:** B lymphocyte-induced maturation protein-1

## C

**CCL5 :** Chemokine (C-C motif) ligand 5

**CMH-I/II :** Complexe majeur d'histocompatibilité de type I/II

**CPA :** Cellule présentatrice d'antigènes

**CTLA-4:** Cytotoxic T-lymphocyte-Associated protein 4

## D

**DAMPs:** Damage-Associated Molecular Pattern

**DC:** Dendritic cells

**DISC:** Death-Inducing Signaling Complex

**DLG1:** Discs Large Homolog 1

## E

**EBV:** Epstein-Barr virus

**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor

**Eomes:** Eomesodermin

## F

**FADD:** Fas-Associated protein with Death Domain

**Fas-L:** Fas-Ligand

**FGFR:** Fibroblast Growth Factor Receptor

**Flt3-L:** Flt3-Ligand

**FRC:** Fibroblastic Reticular Cells

## G

**GAGE** : Gastric antigen

**GM-CSF**: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

**GITR**: Glucocorticoid-induced TNFR family related gene

## H

**HBV**: *Hepatitis B Virus*

**HCV**: *Hepatitis C Virus*

**HEV**: High Endothelial Venules

**HPV**: *Human Papillomavirus*

## I

**ICAM**: Intercellular Adhesion Molecule

**ICB**: Immune Checkpoint Blokade

**ICOS**: Inducible T-cell costimulator

**IDO**: Indoleamine 2,3-dioxygénase

**IFNR1** : Interferon Gamma Receptor 1

**IgSF**: Immunoglobulin Superfamily

**ITAM**: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

**ITK** : IL-2 inducible T cell kinase

**ITT-like motif**: Immunoreceptor Tyrosine Tail –like motif

## K

**KIR** : Killer cell Ig-like Receptor

## L

**LAD**: Leukocyte adhesion deficiencies

**LAG-3**: Lymphocyte-activation gene 3

**LAT**: Linker for activation of T cells

**Lck**: Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

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

**LT<sub>N</sub>** : Lymphocyte T naïf

**LT<sub>CM</sub>** : Lymphocyte T central mémoire

**LT<sub>EM</sub>** : Lymphocyte T effecteur mémoire

**LT<sub>FH</sub>**: Lymphocyte T follicular helper

**LT<sub>RM</sub>** : Lymphocyte T résident mémoire

**LT<sub>SCM</sub>**: Lymphocyte T Stem-cell memory cells

**LCMV**: Lymphocytic Choriomeningitis Virus

## M

**MAGE-1** : Melanoma-associated antigen -1

**MAGUK**: Membrane-Associated Guanylate Kinases

**MAPK**: Mitogen-Activated Protein Kinases

**MCA** : Methylcholanthrene

**MDSCs**: Myeloid-derived suppressor cells

**MPECs**: Memory Precursor Effector Cells

## N

**Nck**: Non-catalytic region of tyrosine kinase

**NFAT**: Nuclear factor of activated T cells

**Nf- $\kappa$ B**: Nuclear factor-  $\kappa$ B

**NK cells**: Natural killer cells

**NKT cells** : Natural Killer T cells

**NOD**: Nod-Like Receptors

**NSG**: NOD Scid Gamma

**NY-ESO1** : New York esophageal squamous cell carcinoma 1

## O

**OLS**: Organes Lymphoïdes Secondaires

## P

**PAMPs**: Pathogen Associated Molecular Patterns

**PD-1**: Programmed-cell death-1

**PD-L1/2**: Programmed-cell death- Ligand 1/2

**PGE2** : Prostaglandine E2

**PLC- $\gamma$**  : Phospholipase C-  $\gamma$

**PKC**: Protein kinase C

**PI3K**: Phosphoinositide 3-kinase

**PP2A**: Protein phosphatase 2

## R

**RAGE** : Renal antigen

**RMP** : Recepteur Mannose 6-phosphate

## S

**SHP-1/2** : Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-1/2

**SLECs**: Short-Lived Effector Cells

**SLP-76**: SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa

**SMAC**: Central SupraMolecular Activation Complex

## T

**T-bet**: Tbx21

**TCF-1**: Transcription factor T-cell factor 1

**TCR**: T cell Receptor

**TGF- $\beta$** : Transforming Growth Factor

**THD**: TNF-homology domain

**Tim-3**: T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

**TIGIT**: T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

**TLR**: Toll-Like Receptors

**TNFR**: Tumor-necrosis factor receptor

**TRAF-1/2**: TNFR-associated factor-1/2

**TRAIL**: TNF-related apoptosis-inducing ligand

**TRAILR1/2**: TRAIL receptor 1/2

## V

**VEGF**: Vascular endothelial growth factor

## W

**WASp** : Wiskott–Aldrich Syndrome protein

## Z

**ZAP-70**: Zeta-chain-associated protein of 70 kDa



# Table des Illustrations

<b>FIGURE 1</b> : LE DR WILLIAM B. COLLEY DEMONTE QUE LE SYSTEME IMMUNITAIRE EST IMPLIQUE DANS L'IMMUNOSURVEILLANCE ANTITUMORALE.....	14
<b>FIGURE 2</b> : LES TROIS PHASES DE L'IMMUNOEDITING .....	16
<b>FIGURE 3</b> : UNE FORTE INFILTRATION DES LYMPHOCYTES T CD8 <sup>+</sup> DANS LES TUMEURS EST ASSOCIEE A UNE MEILLEURE SURVIE DES PATIENTS ATTEINTS DE CANCER. ....	22
<b>FIGURE 4</b> : UNE FORTE DENSITE D'INFILTRAT DE LYMPHOCYTES T AUGMENTE LE TEMPS DE SURVIE GLOBALE DES PATIENTS ATTEINTS DE CANCER COLORECTAL. ....	23
<b>FIGURE 5</b> : FORMATION D'UNE SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE MATURE .....	28
<b>FIGURE 6</b> : MECANISMES INTRACELLULAIRES DU « PROCESSING » DES PEPTIDES ANTIGENIQUES PAR LES CELLULES CANCEREUSES.....	29
<b>FIGURE 7</b> : LA SIGNALISATION DU TCR .....	31
<b>FIGURE 8</b> : MOTIFS INTRACYTOPLASMIQUES DE CD28 A L'ORIGINE DE LA TRANSDUCTION DES SIGNAUX COACTIVATEURS.....	32
<b>FIGURE 9</b> : SIGNALISATION DE CD28 DANS LES LYMPHOCYTES T .....	34
<b>FIGURE 10</b> : VOIE DE SIGNALISATION DES TNFR.....	36
<b>FIGURE 11</b> : EFFETS DE L'ANTI-CD137 SUR LES MEDIEATEURS DE LA REPOSE IMMUNITAIRE IN VIVO .....	38
<b>FIGURE 12</b> : ENSEMBLE DES DIFFERENTES STRATEGIES IMMUNOTHERAPEUTIQUES BASEES SUR L'INJECTION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-CD137.....	40
<b>FIGURE 13</b> : MODELES D'ACTION RESPECTIVES DE LA PERFORINE ET DE LA GRANZYME B DANS L'INDUCTION DE L'APOPTOSE DE LA CELLULE CIBLE.....	46
<b>FIGURE 14</b> : LA VOIE FAS-L/FAS INDUIT L'APOPTOSE PAR DEUX MECANISMES DIFFERENTS.....	47
<b>FIGURE 15</b> : ROLES DE L'IFN-GAMMA DANS L'IMMUNOSURVEILLANCE .....	49
<b>FIGURE 16</b> : LES MODALITES DU PRIMING DES LT CD8 <sup>+</sup> CONDITIONNENT LEUR DIFFERENTIATION EN CELLULES EFFECTRICES ET EN CELLULES MEMOIRES .....	58
<b>FIGURE 17</b> : ROLES DE BCL-6 ET BLIMP1 DANS LA DIFFERENTIATION DES LT CD8 <sup>+</sup> .....	59
<b>FIGURE 18</b> : CTLA-4 INHIBE LES FONCTIONS DE CD28.....	61
<b>FIGURE 19</b> : CTLA-4 INHIBE L'ACTIVATION PRECOCE DES LYMPHOCYTES T .....	62
<b>FIGURE 20</b> : VOIE DE SIGNALISATION DE PD-1 .....	66
<b>FIGURE 21</b> : EXPRESSION DES LIGANDS DE PD-1 PAR DE NOMBREUX TISSUS TUMORAUX, CHEZ L'HOMME .....	68
<b>FIGURE 22</b> : PD-1 REGULE L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T AU SITE TUMORAL .....	69
<b>FIGURE 23</b> : LES ANTICORPS BLOQUANTS UTILISES ACTUELLEMENT EN MONOTHERAPIE ANTITUMORALE .....	71
<b>FIGURE 24</b> : LES IMMUNOTHERAPIES FUTURES CONSISTENT A INHIBER LES RECEPTEURS INHIBITEURS ET A ACTIVER LES RECEPTEURS ACTIVATEURS POUR POTENTIALISER PLUS EFFICACEMENT LA REPOSE ANTITUMORALE T .....	73
<b>FIGURE 25</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA SYNERGIE DES IMMUNOTHERAPIES ANTI-CD137 ET ANTI-PD-1.....	74
<b>FIGURE 26</b> : LE BLOCAGE DE PD-1 ET CTLA-4 RESTAURE LES FONCTIONS EFFECTRICES DES LT CD8 <sup>+</sup> EPUISES.....	76
<b>FIGURE 27</b> : LES LYMPHOCYTES T EPUISES PEUVENT ETRE FONCTIONNELLEMENT IDENTIFIES SUR LES NIVEAUX D'EXPRESSION DE PD-1 ET SUR L'EXPRESSION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION EOMES ET TBET .....	79
<b>FIGURE 28</b> : LES DIFFERENTS TYPES D'INTERACTIONS ENTRE LES NECTINES, LES NECTINES-LIKE ET LEURS LIGANDS .....	81
<b>FIGURE 29</b> : STRUCTURE DE CD226 ET SEQUENCES D'ACIDES AMINES DU DOMAINE INTRACYTOPLASMIQUE .....	84
<b>FIGURE 30</b> : LES ACIDES AMINES IMPLIQUES DANS LA SIGNALISATION DE CD226 SONT CONSERVES ENTRE L'HOMME ET LA SOURIS..	85
<b>FIGURE 31</b> : ACTIONS SYNERGIQUES DE L'ENGAGEMENT DE CD226, 2B5 ET LFA-1 DANS L'ACTIVATION DES FONCTIONS CYTOLYTIQUES DES CELLULES NK.....	87
<b>FIGURE 32</b> : DIVERSITE DES INTERACTIONS ENTRE LES RECEPTEURS DES CELLULES NK ET LEURS LIGANDS EXPRIMES PAR LES CELLULES CIBLES .....	88
<b>FIGURE 33</b> : MODELE DES INTERACTIONS DYNAMIQUES ENTRE CD226, LFA-1 ET LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE SUITE A L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T.....	96
<b>FIGURE 34</b> : LE STRESS GENOTOXIQUE DES CELLULES TUMORALES FAVORISE LEUR RECONNAISSANCE PAR LES CELLULES NK .....	101
<b>FIGURE 35</b> : ALIGNEMENT DES SEQUENCES DE TIGIT HUMAIN ET MURIN .....	106
<b>FIGURE 36</b> : TIGIT INHIBE L'ACTIVATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NFkB EN INHIBANT L'AUTO-UBIQUITINATION DE TRAF-6108	

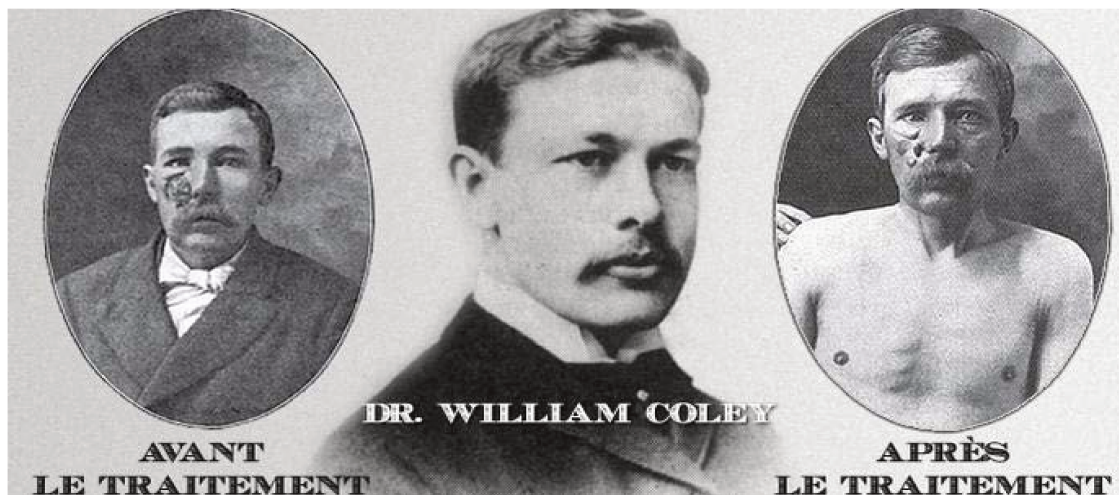
<b>FIGURE 37</b> : TIGIT INHIBE L'HOMODIMERISATION DE CD226 EN CIS AFIN D'EMPECHER SON INTERACTION AVEC CD226.....	111
<b>FIGURE 38</b> : TIGIT LIMITE LES FONCTIONS ANTITUMORALES DES LT CD8 <sup>+</sup> EN LIMITANT LES INTERACTIONS ENTRE CD226 ET CD155 (PVR).....	114
<b>FIGURE 39</b> : REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DES DIFFERENTES FORMES DE CD96 CHEZ L'HOMME ET CHEZ LA SOURIS .....	114
<b>FIGURE 40</b> : MODELE SUGGERE POUR LE ROLE DE PD-1 DANS L'INHIBITION DU SIGNALING DE CD226 .....	179
<b>FIGURE 41</b> : LES DIFFERENTES GENERATIONS DE CELLULES CAR T .....	181
<b>TABEAU 1</b> : ENSEMBLE DES ANTIGENES TUMORAUX RECONNUS PAR LES LYMPHOCYTES T CD8 <sup>+</sup> .....	20

# I. INTRODUCTION

## A. L'immunosurveillance antitumorale

### 1. Rappel historique

L'hypothèse de « l'immunosurveillance » antitumorale selon laquelle le système immunitaire est impliqué dans la reconnaissance et le contrôle de la prolifération des tumeurs a été initialement formulée au début du XX<sup>ème</sup> siècle par Paul Ehrlich puis reprise par Franck MacFarlane Brunet et Lewis Thomas dans les années 1950. Elle repose essentiellement sur les découvertes du docteur William B. Cooley qui observe en 1891 qu'une infection par une bactérie responsable de l'érysipèle conduit à la régression de la tumeur chez un patient atteint de sarcome osseux. Ces observations suggèrent pour la première fois que la stimulation du système immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle la croissance tumorale. Les résultats issus de ces observations ont conduit à la création des toxines de Coley à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle qui ont permis de réduire la taille des tumeurs chez des patients en phase terminale (*Figure 1*).



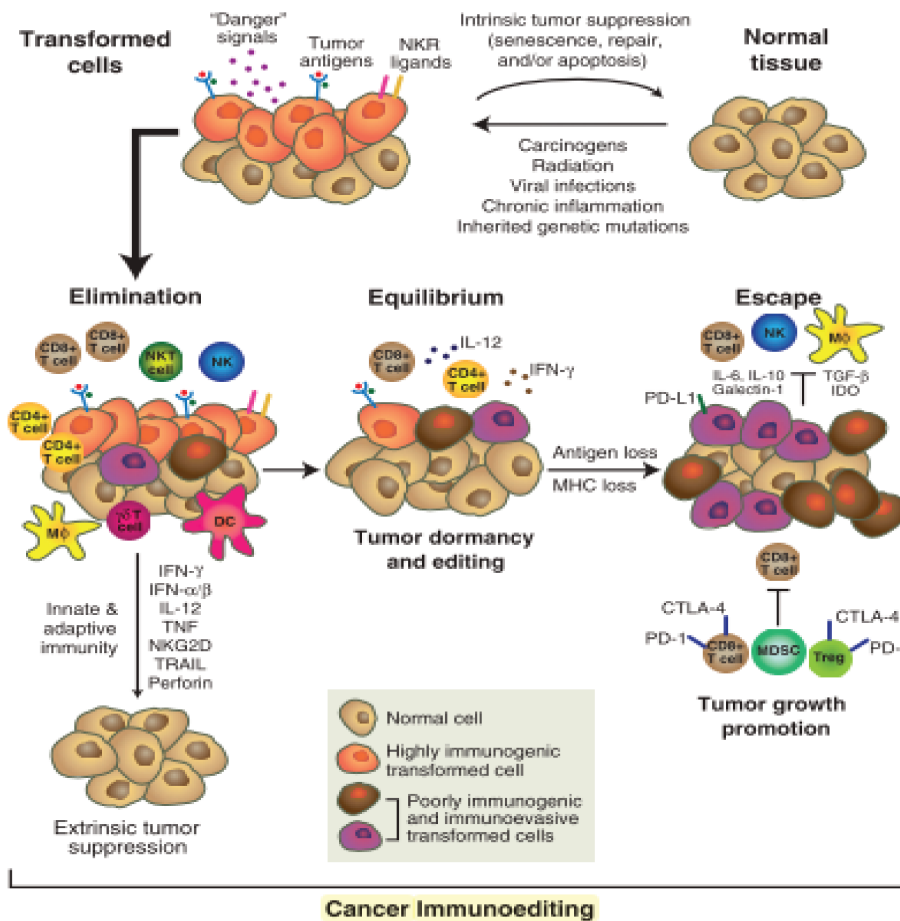
**Figure 1** : En 1891, le Dr William B. Coley démontre que le système immunitaire est impliqué dans l'immunosurveillance antitumorale.

Le chirurgien Willaim B. Coley découvre que la surinfection bactérienne résultant des multiples opérations de son patient atteint de sarcome osseux est à l'origine de la régression de la tumeur. En 1893, la creation des toxines de Coley (vaccins contenant des bactéries mortes) a permis de faire régresser sensiblement la taille des tumeurs chez de nombreux patients (photo).

Vers la fin des années 1990, le concept de l'immunosurveillance est confirmé au travers des travaux menés sur des souris immunodéficientes dépourvues de la cytokine pro-inflammatoire IFN- $\gamma$  ou de son récepteur (IFNR1) et sur des souris dépourvues de lymphocytes T, B et NKT (souris RAG2<sup>-/-</sup>). Ces expériences ont démontré pour la première fois le rôle majeur de l'IFN- $\gamma$  et des lymphocytes dans la protection de l'hôte contre la formation de tumeurs induites par des agents chimiques carcinogènes (MCA, Methylcholanthrene) et dans le contrôle de la croissance tumorale (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001; Street, Cretney, & Smyth, 2001). Malgré le rôle du système immunitaire dans la reconnaissance spécifique et l'élimination des tumeurs, une étude effectuée en 2001 révèle la complexité des interactions entre les acteurs de la réponse immunitaire et les cellules cancéreuses. Chez la souris, des expériences de transplantations de tumeurs induites par le MCA ont en effet démontré que 40% des tumeurs issues de souris immunodéficientes RAG2<sup>-/-</sup> sont éliminées par le système immunitaire de souris naïves syngéniques sauvages, contrairement aux tumeurs issues de souris immunocompétentes qui se développent progressivement (Shankaran et al., 2001). Ces résultats montrent qu'au-delà de protéger l'hôte de la croissance tumorale, le système immunitaire modifie l'immunogénicité des cellules cancéreuses.

## 2. L'immunoediting

Le concept de « l'immunoediting » proposé au début des années 2000 par Robert Schreiber décrit ainsi la dualité des rôles du système immunitaire dans la protection contre le développement tumoral et dans le remodelage de la tumorigénicité des cellules cancéreuses. L'immunoediting est un ensemble de processus dynamiques mis en place par le système immunitaire pour éliminer les cellules cancéreuses et contrôler la progression tumorale (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002). Il comprend trois phases successives suivant la « règle des trois E » : (i) la phase d'Elimination, (ii) la phase d'Equilibre et (iii) la phase d'Echappement (*Figure 2*).



**Figure 2 :** Les trois phases de l'immunoediting

From Robert D. Schreiber, Lloyd J. Old and Mark J. Smyth, *Cancer immunoediting: Integrating the role of immunity in cancer suppression and promotion* Science, 2011

Dans les temps précoces de la phase d'élimination, les cellules de l'immunité innée recrutées au site de la tumeur reconnaissent les cellules tumorales et produisent principalement de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-12 pour conduire à leur apoptose. Les débris cellulaires issus de l'apoptose des cellules tumorales sont ensuite ingérés par les cellules dendritiques qui activent les lymphocytes T de l'immunité adaptative dans les ganglions drainants. Les lymphocytes T activés tuent ensuite spécifiquement les cellules tumorales. La phase d'équilibre est caractérisée par le maintien de la croissance tumorale par les lymphocytes T et précède la phase de l'échappement. La phase de l'échappement décrit l'échappement des variants tumoraux au système de reconnaissance par les LT ainsi qu'à leurs fonctions effectrices. La diminution de l'expression du CMH-I par les cellules tumorales, le microenvironnement immunosuppresseur et l'expression de récepteurs inhibiteurs par les LT sont des mécanismes majeurs impliqués dans cette phase.

La phase d'élimination est caractérisée par la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales par les lymphocytes de l'immunité innée (lymphocytes NK et NKT) et les lymphocytes de l'immunité adaptative (lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) recrutés par chimiotactisme au site tumoral riche en médiateurs solubles pro-inflammatoires (histamine, chimiokines et cytokines).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont des lymphocytes T cytotoxiques qui possèdent les caractéristiques des lymphocytes de l'immunité innée et de l'immunité adaptative puisqu'ils sont capables de reconnaître via leur TCR des motifs moléculaires microbiens. Leurs rôles dans l'immunité antitumorale restent actuellement mal caractérisés (Y. Zhao, Niu, & Cui, 2018). Malgré la stimulation optimale des réponses immunitaires antitumorales dans la phase d'élimination, celles-ci ne parviennent pas toujours à détruire totalement les cellules cancéreuses. Ainsi, une phase d'équilibre se met en place entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales résiduelles. C'est une phase dynamique où les lymphocytes T contrôlent la croissance tumorale mais conditionnent également la survie de variants tumoraux. Chez certains patients atteints de cancer, la phase d'équilibre peut perdurer de nombreuses années et rendre indétectable la tumeur. Cependant, elle est généralement rompue dans la majeure partie des cas. En effet, de nombreuses cellules tumorales acquièrent progressivement des mutations génétiques qui leur confèrent des propriétés phénotypiques et fonctionnelles leur permettant d'échapper au système immunitaire. Au cours de la phase d'échappement, les cellules tumorales emploient donc de nombreuses stratégies pour résister à la reconnaissance et à la destruction par les cellules immunitaires. Parmi celles-ci : la production de TGF- $\beta$  favorise la tumorigenèse et inhibe la prolifération, la différenciation et les fonctions effectrices de nombreuses cellules immunitaires ( lymphocytes T, cellules NK, lymphocytes B et granulocytes) (Pasche, 2001; Rubtsov & Rudensky, 2007) tandis que la production d'IL-10 contribue à l'échappement de la tumeur en diminuant l'expression des molécules impliquées dans les mécanismes de reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T (Sato et al., 2011; Yue et al., 1997). Par ailleurs, la surexpression de l'enzyme IDO (Indoléamine 2,3-dioxygénase) par les cellules tumorales dégrade le tryptophane du milieu extracellulaire, nécessaire à la survie et aux fonctions effectrices des lymphocytes T (Wu, Gong, & Liu, 2018).

Aussi, les métabolites toxiques issus du catabolisme du tryptophane (kyuréninine) présents dans le microenvironnement tumoral, conduisent à l'apoptose des cellules immunitaires. Les cellules tumorales recrutent également des cellules aux propriétés immunosuppressives tels que lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs (LTreg) et les MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells) qui contribuent à leur croissance et à l'inhibition des fonctions des lymphocytes T (Shevach, 2018; Umansky & Sevko, 2013). De façon importante, les cellules tumorales expriment à leur surface des ligands qui interagissent avec les récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T afin de réguler négativement leurs fonctions effectrices.

Les rôles des différents récepteurs immunorégulateurs des LT CD8<sup>+</sup> seront développés dans les prochains chapitres de ce manuscrit. Les immunothérapies visant à renforcer les fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> via l'inhibition de ces interactions est l'une des avancées scientifiques majeures dans le traitement contre le cancer, utilisées actuellement en combinaison avec des traitements conventionnels de chimiothérapie et de radiothérapie.

### 3. Les lymphocytes cytotoxiques T CD8<sup>+</sup>

#### *a) Reconnaissance des tumeurs par les LT CD8<sup>+</sup>*

Les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sont des lymphocytes de l'immunité adaptative qui reconnaissent spécifiquement des antigènes tumoraux présentés par le complexe CMH-I ( Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I) exprimé par les cellules tumorales. L'identification des antigènes tumoraux par Lloyd J. Old en 1964 sur de nombreuses tumeurs murines a permis de mettre en place des protocoles d'immunisation qui ont démontré que la reconnaissance des cellules tumorales par les LT CD8<sup>+</sup> active leurs fonctions cytotoxiques et conduit à l'élimination de la tumeur. Chez l'Homme, l'équipe de Thierry Boon identifie pour la première fois l'antigène tumoral MAGE-1 (Melanoma-associated antigen -1) à la surface de lignées cellulaires de mélanomes issus de patients comme étant la cible spécifique de clones de LT CD8<sup>+</sup> autologues (Van Der Bruggen et al., 1991).

Les protocoles de stimulation de clones lymphocytaires avec des lignées tumorales autologues ont ainsi permis d'identifier d'autres antigènes tumoraux (GAGE, BAGE, RAGE) exprimés par de nombreux types de tumeurs humaines (mélanome, carcinomes du poumon et de la vessie, sarcomes) (Boon, 1996; Van Den Eynde & Van Der Bruggen, 1997). Il existe plusieurs catégories d'antigènes tumoraux suivant leurs profils d'expression et leurs origines (*Tableau 1*) (Pierre G. Coulie, Van Den Eynde, Van Der Bruggen, & Boon, 2014). Les antigènes spécifiquement exprimés par les cellules tumorales peuvent être sous-divisés en trois classes : (i) les antigènes mutationnels issus d'altération(s) génique(s) (p53 et KRAS) ou d'une translocation chromosomique (néo-antigène) ; (ii) les antigènes surexprimés (HER-2/neu) et (iii) les antigènes provenant d'agents pathogènes viraux (EBV, HBV, HCV et HPV).

Bien que les « cancer testis antigens » (MAGE, NY-ESO1) soient des antigènes exprimés spécifiquement par les cellules tumorales, ils sont également exprimés par les cellules germinales. Enfin, les antigènes de différenciation sont exprimés au sein d'un tissu particulier, aussi bien par les cellules saines que les cellules tumorales. Dans le cadre du mélanome, les antigènes de différenciation sont Melan-A/MART-1, tyrosinase, gp100, gp75 et TRP-1.



Gene/protein	Tumor type	Human leukocyte antigen (HLA)		Peptide	Position	Reference
		Class I	CD8 T-cell epitope			
LPGAT1	Bladder tumor	B44	AEPINIQTW		262–270	(56)
CASP-8	Head and neck SCC	B35	FPSDSWCYF		476–484	(57)
Beta-catenin	Melanoma	A24	SYLDSGIHF		29–37	(58)
CDK4	Melanoma	A2	ACDPHSGHFV		23–32	(59)
CDKN2A	Melanoma	A11	AVCPWTWLRG		125–133 (p14ARF-ORF3)	(60)
HLA-A11d	Melanoma					
CLPP	Melanoma	A2	ILDKVLVHL		240–248	(61)
GPNMB	Melanoma	A3	TLDWLLQTPK		179–188	(62)
RBAF600	Melanoma	B7	RPHMPESAF		329–337	
SIRT2	Melanoma	A3	KIFSEVTLK		192–200	
SNRPD1	Melanoma	B38	SHETVIEL		11–19	
SNRP116	Melanoma	A3	KILDAVAQK		668–677	
MART2	Melanoma	A1	FLEGNEVGKTY		446–455	(63)
MUM-1f	Melanoma	B44	EEKLIVLFL		30–38	(64)
MUM-2	Melanoma	B44	SELFRRSGLDSY		123–133	(65)
		Cw6	FRSGLDSYV		126–134	
MUM-3	Melanoma	A68	EAFIQPIIR		322–330	(66)
Myosin class I	Melanoma	A3	KINKNPKYK		911–919	(67)
N-ras	Melanoma	A1	ILDTAGREEY		55–64	(68)
OS-9	Melanoma	B44	KELEGILLL		438–446	(69)
Elongation factor 2	Lung SCC	A68	ETVSEQSNV		581–589	(70)
NFYC	Lung SCC	B52	QQITKTEV		275–282	(71)
Alpha-actinin-4	NSCLC	A2	FIASNGVKLV		118–127	(72)
Malic enzyme	NSCLC	A2	FLDEFMEGV		224–232	(20)
HLA-A2	RCC					(73)
Hsp70-2	RCC	A2	SLFEGIDIYT		288–295	(74)

**Tableau 1** : Ensemble des antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

From Aurélie Durgeau et al, *Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell immunity for More effective Cancer immunotherapy* *Frontiers in Immunology*, 2018

*b) Rôle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans l'immunosurveillance*

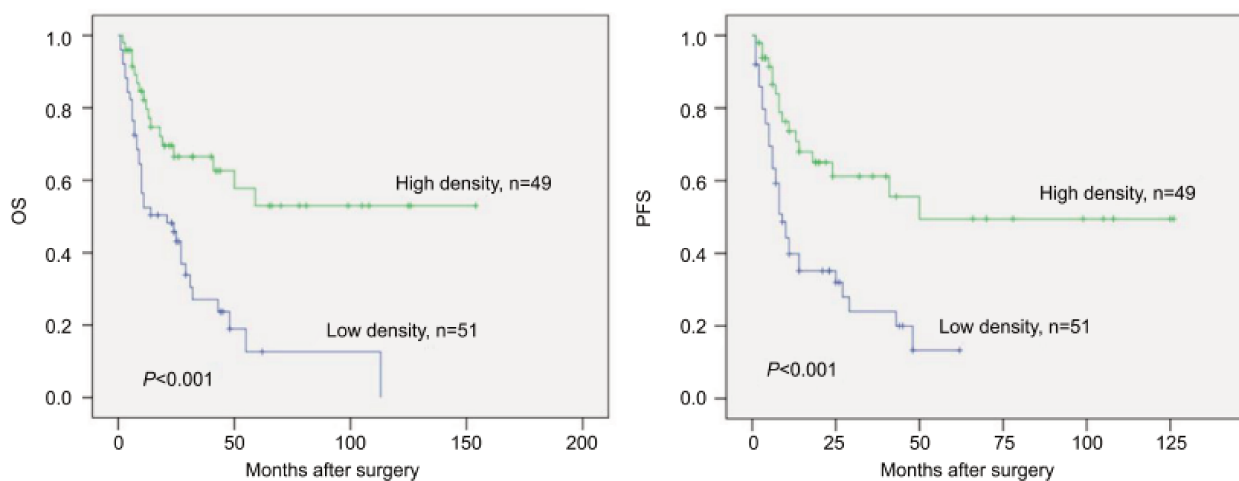
Chez l'Homme, l'existence d'une forte proportion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (LT CD8<sup>+</sup>) au sein de tumeurs de patients atteints de mélanome régressif a initialement permis de suggérer que les LT CD8<sup>+</sup> sont impliqués dans l'immunosurveillance antitumorale (Ferradini et al., 1993). Des analyses moléculaires et fonctionnelles ont révélé par la suite que ces LT CD8<sup>+</sup> sont issus d'une amplification clonale, capables de proliférer et de lyser spécifiquement des cellules tumorales autologues via la reconnaissance spécifique d'antigènes tumoraux exprimés à leur surface (Faure et al., 1993; Van Den Eynde & Van Der Bruggen, 1997; Van Der Bruggen et al., 1991). L'identification des antigènes tumoraux a conduit au développement de stratégies vaccinales thérapeutiques afin d'activer spécifiquement les fonctions antitumorales des LT CD8<sup>+</sup>.

Des études cliniques réalisées sur des patients atteints de mélanome d'un stade avancé ont révélé que l'administration d'un vaccin avec le peptide antigénique MAGE augmente l'infiltrat de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène et conduit à la régression de la tumeur (P. G. Coulie et al., 2001; Thurner et al., 1999). Cependant, la régression tumorale n'est observée que chez une minorité d'entre eux et ne s'accompagne pas toujours d'une réponse clinique à long terme. Il a été suggéré que les échecs des protocoles de vaccination résulteraient d'un manque de connaissances concernant les relations complexes entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées au rôle des LT CD8<sup>+</sup> au cours des différentes phases de la croissance tumorale. Un modèle de tumeur primaire induite par l'injection de MCA a permis de révéler que les LT CD8<sup>+</sup> limitent la dissémination des cellules tumorales au cours de la phase d'équilibre (Koebel et al., 2007). En effet, la déplétion des LT CD8<sup>+</sup> dans les phases tardives de la réponse (200 jours après injection de l'agent carcinogène) conduit au développement rapide de sarcomes. Un modèle de mélanome métastatique (RET.AAD) a par la suite confirmé que les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur maintiennent les cellules tumorales dans un état de « dormance » qui limite l'apparition de métastases dans les phases précoces de la réponse immunitaire (Eyles et al., 2010; R. Lengagne et al., 2008). La déplétion des LT CD8<sup>+</sup> accélère le développement de la croissance tumorale pour former des métastases dans divers organes et réduit significativement la survie des souris.

De nombreux autres modèles pré-cliniques de tumeurs hématopoïétiques ( lymphome et myélome multiple) et de tumeurs solides ( cancer du poumon et mélanome) ont permis de confirmer le rôle majeur des LT CD8<sup>+</sup> dans l'immunosurveillance antitumorale (Diefenbach, Jensen, Jamieson, & Raulet, 2001; Guillerey et al., 2015; Renée Lengagne et al., 2004; Loeser et al., 2007; Tahara-Hanaoka et al., 2006).

c) *Valeur pronostique des LT CD8<sup>+</sup> dans les cancers*

Des analyses clinicopathologiques réalisées sur des patients atteints de divers cancers (cancer rénal, colorectal et cancer de l'ovaire) ont indiqué que la proportion de lymphocytes T infiltrant la tumeur au phénotype cytotoxique et prolifératif est associée à l'expression de nombreux facteurs pro-inflammatoires et à une amélioration de la survie des patients (Galon et al., 2006; Naito et al., 1998; Nakano et al., 2001). Le taux de survie à 5 ans est de 38% chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire dont les tumeurs sont infiltrées par des lymphocytes T tandis qu'il n'est seulement de 4,5% chez des patientes dont les tumeurs ne contiennent pas d'infiltrat lymphocytaire (L. Zhang et al., 2003). L'analyse de la distribution et de la valeur pronostique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs a révélé que l'augmentation de leur proportion est positivement corrélée à une meilleure survie globale et sans maladie des patients atteints de cancers du poumon et du sein (*Figure 3*) (Fridman, Pagès, Sautès-Fridman, & Galon, 2012;

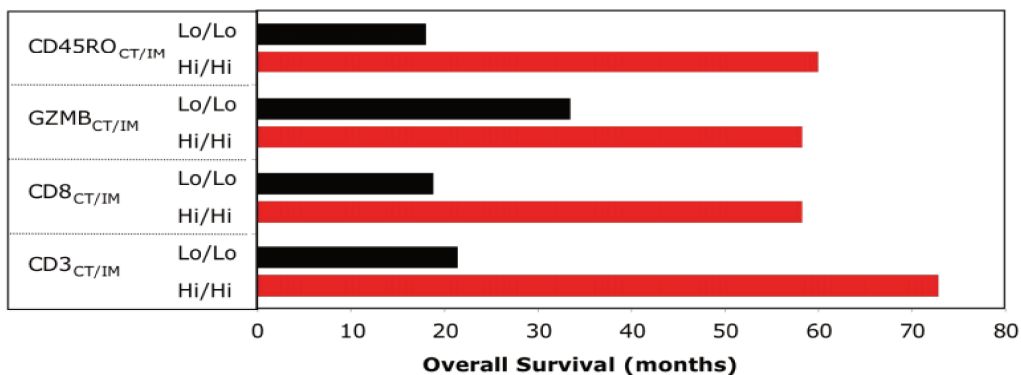
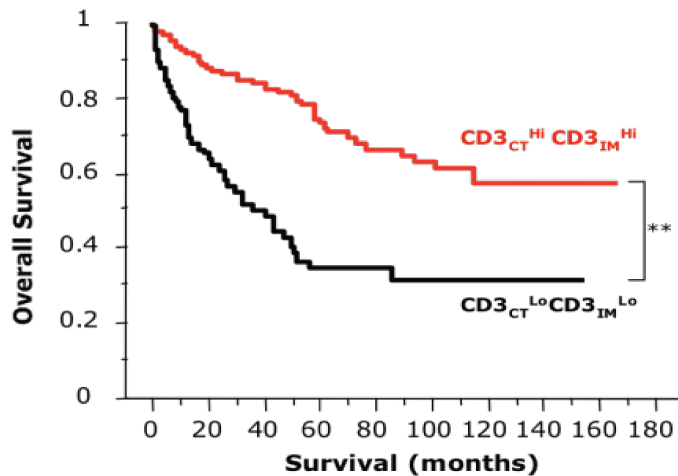


**Figure 3 :** Une forte infiltration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans les tumeurs est associée à une meilleure survie des patients atteints de cancer. Courbes de survie de Kaplan-Meier démontrant que le taux de LT CD8<sup>+</sup> est associé à une meilleure survie globale et sans maladie de patientes atteintes d'un cancer du sein (OS, Overall Survival) et sans maladie (PFS, Progression Free Survival)

From J. Chen et al, *Distribution and prognostic value of tumor-infiltrating T cells in breast cancer* *Molecular Medicine Reports* 2018

Meng et al., 2018; Saleh et al., 2017).

Aussi, des analyses transcriptionnelles et immunohistochimiques effectuées sur des cohortes de patients atteints de cancer colorectal ont révélé que la densité des LT CD8<sup>+</sup> au sein des zones centrales et plus marginales de la tumeur est positivement corrélée une meilleure survie des patients et permet de la prédire (Figure 4) (Galon et al., 2006). En combinant des résultats de divers études indépendantes, une méta-analyse effectuée récemment sur des cas de patients atteints de carcinome hépatocellulaire a indiqué qu'une faible proportion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> intratumoraux constitue un bon facteur pronostic de développement de la maladie et qu'il peut prédire la taille de la tumeur (X. Xu et al., 2019).



**Figure 4 :** Une forte densité d'infiltrat de lymphocytes T (caractérisés par l'expression du CD3) dans les zones centrales et marginales de la tumeur (High/High) augmente le temps de survie globale des patients atteints de cancer colorectal.

Le marqueur Granzyme B (GZMB) caractérise les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et le marqueur CD45RO identifie les lymphocytes T mémoires

Il est cependant nécessaire de noter que l'infiltration des LT CD8<sup>+</sup> dans les tumeurs ne constitue pas toujours un facteur de bon pronostic. En effet, des études cliniques ont révélé qu'une forte densité de LT CD8<sup>+</sup> au site tumoral est associée à une faible survie chez des patients atteints de mésothélium de type non épithéloïde (Chee et al., 2017) et de lymphomes (Muris et al., 2004). Il a également été décrit qu'un pourcentage élevé de LT CD8<sup>+</sup> dans les tissus métastatiques de carcinome rénal est corrélé à une faible survie globale des patients (Remark et al., 2013).

## B. Activation et différenciation des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques

### 1. La reconnaissance spécifique de l'antigène peptidique

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> expriment à leur surface le TCR (T Cell Receptor) qui leur permet de reconnaître spécifiquement un antigène peptidique présenté par le complexe CMH-I exprimé à la surface de cellules professionnelles présentatrices d'antigène (CPA). L'activation des LT CD8<sup>+</sup> naïfs (LT<sub>N</sub> CD8<sup>+</sup>) par les CPA conduit à l'expansion de clones de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène qui se différencient progressivement en effecteurs cytotoxiques. Ce processus biologique appelé « priming » du LT<sub>N</sub> CD8<sup>+</sup> est nécessaire au développement d'un nombre suffisant de LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques qui recirculent dans le sang pour reconnaître et éliminer efficacement les cellules infectées ou les cellules tumorales. Les cellules dendritiques (DC) constituent les CPA les plus efficaces pour activer les LT CD8<sup>+</sup> naïfs (Jung et al., 2002). Elles sont réparties de façon très hétérogène dans l'organisme. Elles sont localisées au sein des organes lymphoïdes primaires et secondaires mais également dans les tissus périphériques, notamment au niveau des principaux sites d'entrée des pathogènes tels que la peau et les muqueuses. Les DC sont des cellules sentinelles initialement « immatures » qui patrouillent dans le corps afin de détecter la présence de signaux étrangers par des mécanismes d'endocytose et de phagocytose. Les DC reconnaissent les motifs conservés des pathogènes appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) par l'intermédiaire de leurs récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) tels que les TLR (Toll-Like Receptors), les récepteurs lectine de type C et les récepteurs intracytoplasmiques de type NOD (Nod-Like Receptors).

La reconnaissance de ces signaux conduit à la « maturation » des DC pour qu'ils puissent augmenter leurs capacités de phagocytose de façon transitoire (Savina & Amigorena, 2007) et augmenter l'expression des molécules de CMH-I et CMH-II responsables de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> et des LT CD4<sup>+</sup> dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), respectivement. En effet, les DC activées acquièrent la capacité de migrer vers les OLS (rate, ganglions lymphatiques et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) où elles présenteront aux lymphocytes T les antigènes peptidiques qu'elles ont capturés puis phagocytés.

Lorsque la DC est infectée par un pathogène intracellulaire, elle présente l'antigène peptidique apprêté sur des molécules de CMH-I. Bien qu'un antigène d'origine exogène (capté par endocytose ou phagocytose) soit généralement apprêté par le CMH-II à la surface des cellules dendritiques, il peut également être apprêté par le CMH-I. Ce processus appelé « cross-présentation » joue un rôle critique dans l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> antitumoraux *in vivo* chez la souris (Albert, Sauter, & Bhardwaj, 1998). Chez l'Homme, une étude récente a révélé que les DC issus d'ascites de la cavité péritonéale de patients atteints de cancer sont également capables de « cross-présentation » antigénique (Tang-Huau et al., 2018).

## 2. Activation des LT CD8<sup>+</sup> antitumoraux

### *a) Présentation de l'antigène tumoral dans les ganglions lymphatiques*

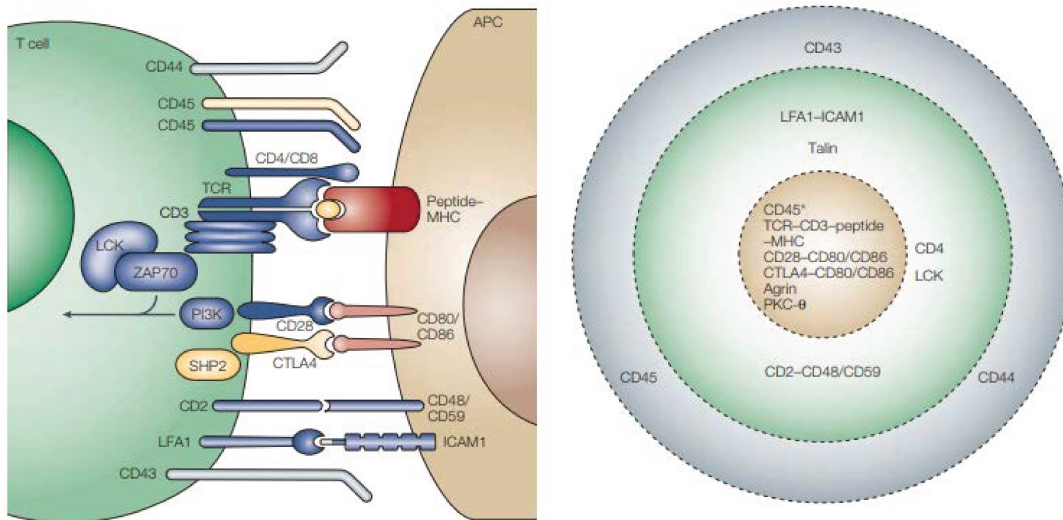
Au site de la tumeur, les DC peuvent reconnaître des lysats, des fragments ou des corps apoptotiques des cellules tumorales considérés comme des signaux de danger appelés DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern). Les DC ingèrent puis dégradent par protéolyse ces facteurs solubles présents dans le microenvironnement afin de se différencier en cellules matures. La maturation des DC peut être favorisée par la présence de facteurs solubles pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-1) sécrétés notamment par les cellules de l'immunité innée telles que les NK et les NKT (Natural Killer T Cells) (Fujii, Liu, Smith, Steinman, & Bonito, 2004). Les cellules dendritiques, caractérisées par une surexpression du CMH-I et des récepteurs de costimulation lymphocytaire B7.1 (CD80) et B7.2(CD86), migrent vers la région corticale des ganglions lymphatiques drainant la tumeur (zones T) pour activer les LT<sub>N</sub> CD8<sup>+</sup>.

L'expression du récepteur CCR7 à la surface des  $LT_N CD8^+$  favorise leur recrutement par chimiotactisme et leur rétention au niveau des ganglions lymphatiques via la sécrétion des chimiokines homéostatiques CCL19 et CLL21 par les FRC ( Fibroblastic reticular cells) (Bajénoff et al., 2006; Denton, Roberts, Linterman, & Fearon, 2014). La migration des  $LT_N CD8^+$  de la circulation sanguine aux ganglions lymphatiques est également favorisée par l'expression de la sélectine CD62-L qui permet de ralentir progressivement les  $LT_N CD8^+$  le long de la paroi des vaisseaux sanguins lymphatiques ( HEV, High Endothelial Venules) (Miyasaka & Tanaka, 2004). Les interactions primaires entre les cellules dendritiques et les  $LT CD8^+$  s'opèrent de façon transitoire entre les intégrines ICAM-1/ICAM-2 et LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1, ou CD11a/CD18) ainsi qu'entre CD58 et CD2, respectivement. Par l'intermédiaire de leur TCR, les  $LT CD8^+$  reconnaissent spécifiquement le peptide tumoral présenté par la molécule CMH-I à la surface de la cellule dendritique (Marzo et al., 1999).

L'activation du lymphocyte T  $CD8^+$  résultant de cette interaction induit un signal « inside-out » qui induit le changement conformationnel de LFA-1. La forme « active » de LFA-1 interagit davantage avec son ligand ICAM-1 pour renforcer et stabiliser les zones de contact entre les lymphocytes T  $CD8^+$  et les CPA au niveau de la synapse immunologique. La synapse immunologique (SI) est une structure dynamique qui se forme à l'interface de contact entre les  $LT CD8^+$  et les DC à la suite de la stimulation du TCR. La réorganisation spatiale de zones membranaires localisées (rafts lipidiques) à la SI permet de concentrer l'ensemble des molécules de signalisation impliquées dans l'activation des  $LT CD8^+$ . La zone centrale de la SI (c-SMAC, central SupraMolecular Activation Complex) concentre les complexes TCR/CMH-I : stabilisés par les molécules co-réceptrices CD8 et par les récepteurs coactivateurs ou coinhibiteurs tels que CD28 ou CTLA-1 interagissant avec leurs ligands B7-1 et B7-2 exprimés par les DC. La zone périphérique de la SI ( p-SMAC, peripheral SupraMolecular Activation Complex) concentre les molécules d'adhésion telles que LFA-1 et CD2 qui lient respectivement ICAM-1 et CD58 ( CD48 chez la souris) (Grakoui et al., 1999). Les récepteurs à fort encombrement stériques tels que CD45, CD43 et CD44 sont concentrés dans une région plus distale de la SI (dSMAC, distal SupraMolecular Activation Complex). La réorganisation de ces molécules conduit à la formation d'une synapse immunologique mature qui permet d'intégrer

et amplifier les signaux respectifs des récepteurs immunorégulateurs nécessaires à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> (*Figure 5*) (Bromley et al., 2001).

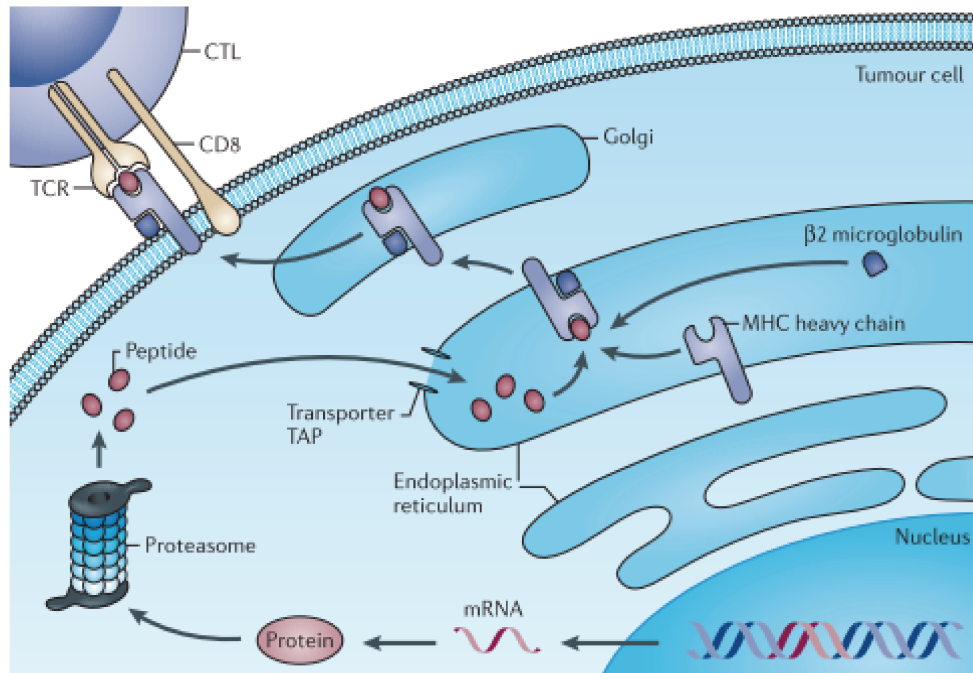




**Figure 5 :** Représentation schématique de la formation d'une synapse immunologique mature

From Johannes B. Huppa and Mark M. Davis *T-cell antigen recognition and the immunological synapse*, *Nature Reviews Immunology* 2003

Une activation optimale des LT CD8<sup>+</sup> dans les ganglions lymphatiques est jugée nécessaire pour pallier les faibles capacités de présentation antigénique par les cellules tumorales. En effet, les modifications de l'expression ou de la composition moléculaire du complexe CMH-I /peptide ainsi que l'altération des voies de signalisation impliquées dans la présentation de l'antigène peuvent conduire à une non-reconnaissance des cellules tumorales par les LT CD8<sup>+</sup> et à un défaut de leur activation (Khong, Wang, & Rosenberg, 2004; Restifo et al., 1996). Dans les ganglions, les LT CD4<sup>+</sup> ayant été activés par les DC exprimant le CMH-II :peptide peuvent fournir une « aide » importante pour générer une réponse efficace des LT CD8<sup>+</sup> antitumoraux. *In vitro*, il a été suggéré que l'interaction entre les récepteurs CD40 et CD40-L exprimés respectivement par les DC et les LT CD4<sup>+</sup> « helper » favorise l'expression des molécules de costimulation B7 et des molécules d'adhésion (ICAM-1) à la surface des DC. Par ailleurs, cette interaction conduit à l'augmentation de production d'IL-12 par les DC qui favorise l'acquisition des propriétés effectrices des LT CD8<sup>+</sup> (S. R. M. Bennett et al., 1998; Cella et al., 1996). Au site tumoral, les LT CD8<sup>+</sup> activés reconnaissent et lysent les cellules tumorales suite à l'interaction entre le TCR et le CMH-I/ peptide (Figure 6) (Bai et al., 2001).



**Figure 6 : Mécanismes intracellulaires du « processing » des peptides antigéniques par les cellules cancéreuses**

From *Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy*, Nature Review 2014

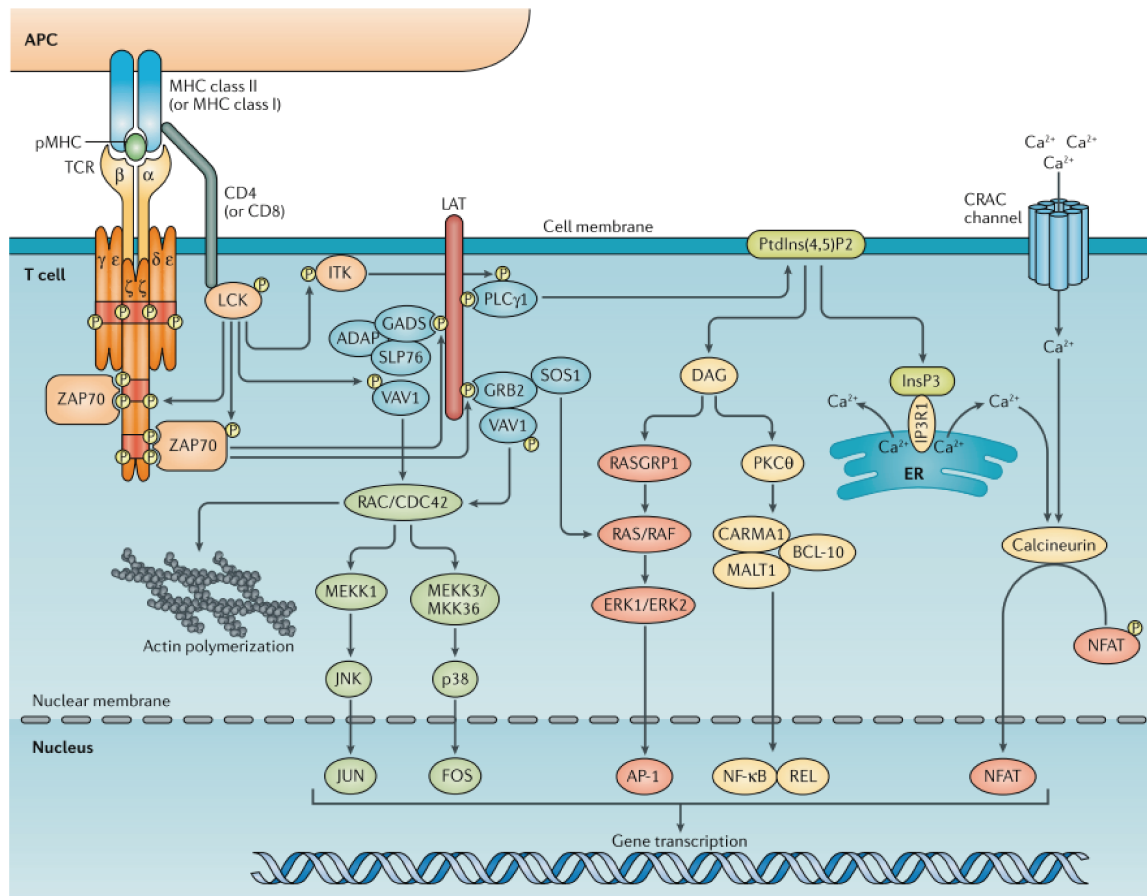
Les peptides issus du clivage des protéines tumorales dans le protéasome pénètrent dans la lumière centrale du REG ( Reticulum Endoplasmique Granulaire) via le transporteur TAP ( *Transporter-associated with antigen processing*) puis s'associent au CMH-I synthétisé dans le REG. La microglobuline  $\beta$ -2 ( $\beta$ -2m) s'associe au complexe nouvellement formé, qui migre ensuite vers la membrane plasmique via l'appareil de Golgi.

### b) Activation et voie de signalisation du TCR

Le TCR est un hétérodimère transmembranaire exprimé par les lymphocytes T constitué des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui lui confèrent sa capacité à lier spécifiquement un antigène. Il est associé de façon non covalente au récepteur CD3 qui comprend les hétérodimères CD3 $\epsilon\gamma$  et CD3 $\epsilon\delta$  et l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$ . Les sous-unités CD3 $\epsilon$ , CD3 $\delta$  et CD3 $\gamma$  possèdent chacune dans leurs parties intracellulaires un domaine consensus riche en tyrosines à l'origine de transductions de signaux activateurs (ITAM, Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), tandis que les sous-unités CD3 $\zeta$  en possèdent trois. Il a été suggéré récemment que la multiplicité et la diversité des motifs ITAM semblent être nécessaires à la transduction optimale des signaux impliqués dans l'activation et la prolifération des cellules T (Bettini et al., 2017). Suite à l'interaction spécifique entre le TCR et le complexe CMH-I /peptide, le co-récepteur CD8 est recruté au niveau des régions conservées du CMH-I pour renforcer cette interaction.

Ce « clustering » permet ainsi à la kinase Lck (famille des kinases Src) constitutivement liée à la partie intracytoplasmique du CD8 de phosphoryler les motifs ITAMs du CD3. Une étude a démontré que la quantité de kinase Lck (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) catalytiquement pré-activée dans le lymphocyte T naïf détermine le degré de phosphorylation des motifs ITAMs (Nika et al., 2010). La kinase ZAP-70 (zeta-chain-associated protein of 70 kDa) lie les motifs ITAMs phosphorylés puis s'active après avoir été phosphorylée par la kinase Lck. ZAP-70 phosphoryle ensuite LAT (Linker for activation of T cells) qui joue un rôle critique dans la poursuite de la signalisation puisqu'elle représente une « plateforme » protéique capable de lier et d'activer de nombreuses molécules telles que la PLC- $\gamma$  ( Phospholipase C-  $\gamma$ ), ITK ( IL-2 inducible T cell kinase), ou encore la protéine adaptatrice ( ou facteur d'échange) Vav-1. Vav-1 interagit avec le cytosquelette d'actine pour « clusteriser » les intégrines (notamment LFA-1) et les TCR au niveau de la synapse immunologique afin d'optimiser l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Fischer et al., 1998; Krawczyk et al., 2002).

La PLC- $\gamma$  génère ensuite les seconds messagers inositol (1,4,5)-triphosphate et DAG. DAG active la PKC ( Protein kinase C) et les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) tandis que l'inositol triphosphate active la calcineurine induisant le relargage du calcium intracellulaire. Ces processus conduisent à l'activation des facteurs de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells), Nf- $\kappa$ B (nuclear factor-  $\kappa$ B) et AP-1 (activation protein-1) qui induisent la transcription des gènes impliqués dans les fonctions effectrices des lymphocytes T. L'expression de CD25 (sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2) permet de former avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  la forme trimérique de haute affinité du récepteur à l'IL-2 afin de favoriser la voie de signalisation de l'IL-2 nécessaire à la survie et les propriétés cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> activés (E. Kelly, Won, Refaeli, & Van Parijs, 2002) (*Figure 7*).



**Figure 7** : La signalisation du TCR

From Guillaume Gaud et al, *Regulatory mechanisms in T cell receptor signaling* Nature Reviews Immunology 2018

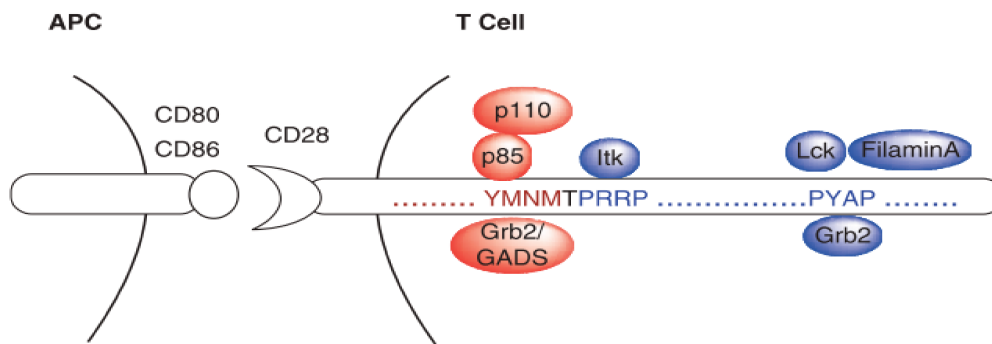
c) Les récepteurs coactivateurs des LT CD8<sup>+</sup>

Bien que l'activation des LT CD8<sup>+</sup> naifs résulte principalement de l'interaction TCR / CMH-I : peptide, la seule stimulation du TCR n'est cependant pas suffisante pour initier leur expansion clonale et l'acquisition de leurs fonctions effectrices. Afin de générer une prolifération accrue des LT CD8<sup>+</sup>, des signaux de costimulations sont nécessaires à l'initiation d'une activation efficace. Le rôle majeur de ceux-ci est d'augmenter l'expression de la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2 ( CD25) à la surface des LT CD8<sup>+</sup> activés par le TCR ainsi que leur production d'IL-2, cytokine majeure impliquée dans la prolifération lymphocytaire.

## (1) CD28

### Structure, expression et voie de signalisation

Le principal récepteur costimulateur des LT CD8<sup>+</sup> est la molécule de surface CD28. CD28 un récepteur homodimérique appartenant la superfamille des immunoglobulines (IgSF), exprimé constitutivement par une vaste majorité des LT CD4<sup>+</sup> et la moitié des LT CD8<sup>+</sup> circulants chez l'Homme. Suite à l'activation du TCR, le domaine extracellulaire de CD28 change de conformation pour adopter une structure bivalente lui permettant d'interagir avec ses ligands B7-1(CD80) / B7-2(CD86) principalement exprimés par les DC matures (M. Sanchez-Lockhart, Kim, & Miller, 2011; Mariano Sanchez-Lockhart et al., 2014). L'interaction de CD28 avec ses ligands induit la phosphorylation de son domaine intracytoplasmique YMNM par les kinases Src p56Lck et p59Fyn constituant ainsi un site de fixation à la sous-unité p85 $\alpha$  de la PI3K et au complexe protéique Grb2 /GADS (Boomer & Green, 2010; Raab et al., 1995) (Figure 8).



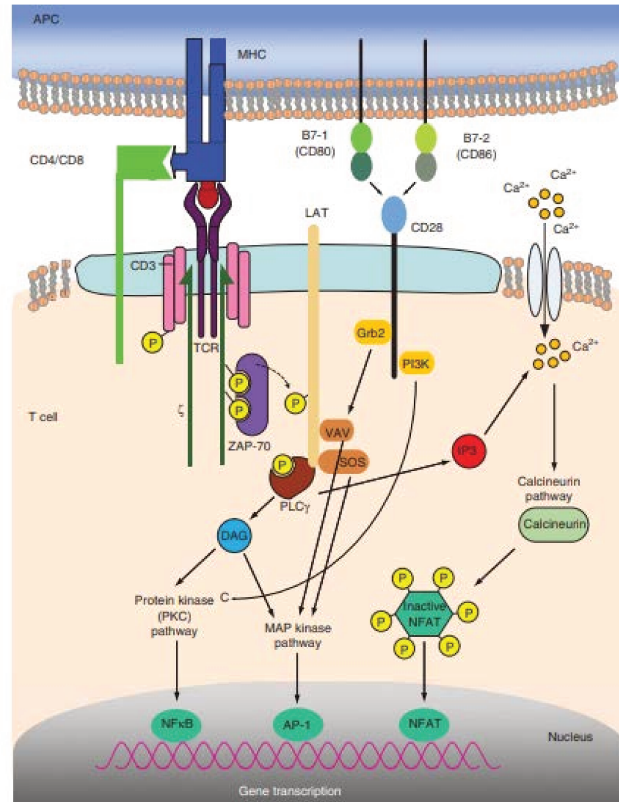
**Figure 8:** Motifs intracytoplasmiques de CD28 à l'origine de la transduction des signaux coactivateurs

From Jonathan S. Boomer and Jonathan M. Green, *An Enigmatic Tail of CD28 Signaling* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010

Il a été suggéré que la phosphorylation de la tyrosine cytoplasmique de CD28 réduit son interaction avec la phosphatase PP2A (proteine phosphatase-2) inhibant ainsi la déphosphorylation inactivatrice de ERK à l'origine de la transduction du signal coactivateur (Chuang et al., 2000; Lisbona, Alemany, & Art, 1997). Les motifs plus distaux PRRP et PYAP (chez la souris, P<sup>175</sup>RRPGP et P<sup>187</sup>YAPA) interagissent avec les domaines SH3 des protéines ITK ainsi que Grb2 et la filamine A (FLNA), respectivement (Figure 8).

En interagissant avec Grb2, CD28 favorise le recrutement et l'activation de Vav-1 par la SPL76 (Dennehy et al., 2007). En augmentant le clustering des intégrines et des TCR à la surface des LT (Krawczyk et al., 2002), Vav-1 conditionne l'activation de la PLC- $\gamma$  qui augmente le flux calcique intracellulaire et conduit à l'activation du facteur de transcription NFAT (Michel et al., 2000). Aussi, l'augmentation de l'activité de Vav-1 contribue à activer la kinase JNK (Jun N-terminal kinase) et le complexe transcriptionnel NFAT/AP1 (Bustelo, 2000; H. Kim, Tharayil, & Rudd, 1998; Schneider & Rudd, 2008). Le recrutement de la PI3K par CD28 contribue principalement à augmenter la synthèse du phosphatidylinositol (PIP3) à l'origine de l'activation de la kinase Akt et du facteur de transcription NF $\kappa$ B (Muscolini et al., 2013).

Il est suggéré que la liaison de la filamine A au niveau du domaine PYAP de CD28 favorise le réarrangement du cytosquelette d'actine nécessaire au clustering des TCR ainsi qu'au recrutement de médiateurs cellulaires impliqués dans la transduction de signaux activateurs (Tavano et al., 2006). Ainsi, CD28 augmente la stabilité de la synapse immunologique (SI) et interagit avec la PKC $\theta$  au niveau de la zone centrale de la SI afin d'activer les protéines situées en aval de la voie de signalisation du TCR telles que NF $\kappa$ B (Sanchez-lockhart et al., 2008). NF $\kappa$ B, NFAT et AP1 sont les facteurs de transcription majeurs impliqués dans la transcription des gènes codant les récepteurs et les cytokines/chimiokines impliqués dans les fonctions effectrices des lymphocytes T, notamment l'IL-2 et CD25, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  (*Figure 9*). Il est intéressant de noter ici qu'une étude réalisée à la fin des années 1990 a révélé que l'augmentation de l'expression de ces protéines est favorisée par une stabilisation de leurs ARNm (Lindsten, June, Ledbetter, Stella, & Thompson, 1989).



**Figure 9 : Signalisation de CD28 dans les lymphocytes T**

From Melissa Y Yeung et al, *Targeting CD28 to prevent transplant rejection*, *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2014

### Fonctions de CD28

Dans les phases précoces de la réponse immunitaire, les signaux coactivateurs issus de l'interaction de CD28 avec ses ligands sont nécessaires à la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> naïfs « primés » et potentialisent leurs fonctions effectrices en régulant positivement la voie de signalisation de l'IL-2. La stimulation de CD28 diminue le seuil d'activation des LT CD8<sup>+</sup> en réduisant le nombre d'interactions entre le TCR et le CMH-I/peptide pour induire une activation efficace des LT CD8<sup>+</sup>. Elle est d'autant plus importante en cas de stimulation transitoire du TCR, qui caractérise notamment les LT de faible affinité pour leurs ligands (Bachmann et al., 1997; Kundig et al., 1996; Linsley & Ledbetter, 1993) qui nécessitent une amplification du signal pour être activés. L'absence de signal de costimulation par CD28 induit un état « d'anergie » des LT CD8<sup>+</sup>. L'anergie des lymphocytes T est un état d'hyporéponse qui caractérise les lymphocytes T incapables de produire de l'IL-2 et donc aux capacités prolifératives défectueuses.

Aussi, le signal de costimulation issu de l'engagement de CD28 maintient la survie des LT en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques (Boise et al., 1995) et en diminuant l'expression de Fas-L (CD95-L) à leur surface (Collette, Razanajaona, Ghiotto, & Olive, 1997).

## (2) ICOS

ICOS est autre coactivateur de la superfamille des immunoglobulines à la structure et aux propriétés fonctionnelles relativement similaires à celles de CD28. Cependant, l'interaction de ICOS à la surface des LT CD8<sup>+</sup> activés avec son ligand ICOS-L (B7-H) exclusivement exprimé par les DC n'induit pas leur production d'IL-2 (Hutloff et al., 1999; Rudd, Taylor, & Schneider, 2009). La présence d'IL-2 exogène est donc nécessaire pour augmenter la prolifération, la sécrétion de cytokines et l'expression des molécules d'adhésion impliquées dans les interactions entre le LT CD8<sup>+</sup> et les DC (Hutloff et al., 1999). Aussi, ICOS est impliqué dans la mise en place d'une réponse humorale en favorisant la différenciation des lymphocytes T<sub>FH</sub> (lymphocytes T follicular-helper) et la maturation des cellules B au sein des centres germinatifs en sécrétant l'IL-10, l'IL-4 et l'IL-13 (Pedros et al., 2016; Riley et al., 2001).

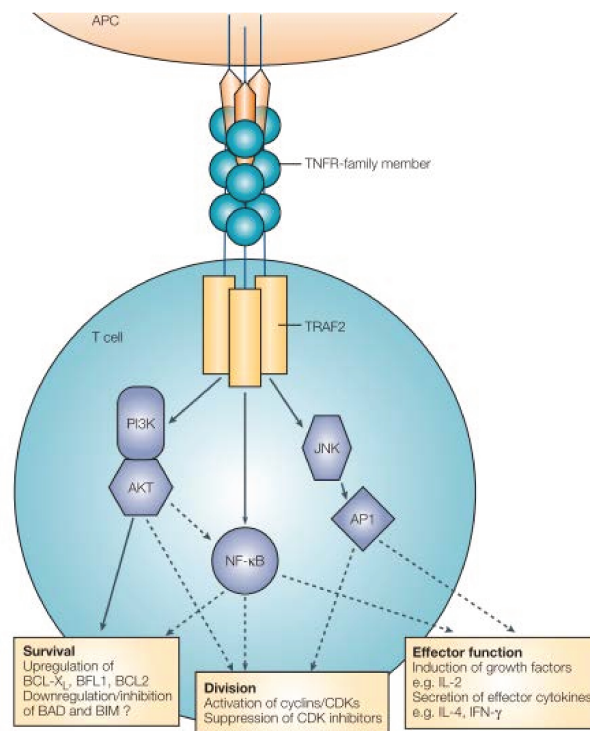
## (3) CD137

### Structure, expression et voie de signalisation

CD137 (4-1BB ou TNFR9) est une glycoprotéine transmembranaire de type I de la superfamille des TNFR (Tumor-necrosis factor receptor) dont l'expression basale par les LT CD8<sup>+</sup> est rapidement up-régulée à la suite de la reconnaissance TCR/CM-I : peptide puis stabilisée en présence d'IL-2 (Verdeil, Nguyen, Auphan-Anezin, Schmitt-Verhulst, & Puthier, 2006). L'engagement de CD28 conduisant à la production d'IL-2 par les LT CD8<sup>+</sup>, CD28 est impliqué dans le maintien ou la surexpression de CD137. Les domaines extracellulaires de CD137 lient sous forme de complexes trimériques le domaine THD (TNF-homology domain) de son ligand CD137-L (4-1BB-L) exprimé par de nombreuses cellules immunitaires (DC matures, monocytes, macrophages et lymphocytes B) et par les cellules tumorales (Shao & Schwarz, 2011; Q. Wang et al., 2008).



Suite à cette interaction, CD137 interagit avec les molécules adaptatrices intracellulaires TRAF-1 (TNFR-associated factor-1) et TRAF-2 (TNFR-associated factor-2) qui indépendamment de la stimulation de CD28 (Saoulli et al., 1998), activent de nombreuses kinases telles que PI3K /Akt, JNK, p38 MAPK et ERK ainsi que des facteurs de transcription (NFκB, AP-1 et STAT5) impliqués dans l'expression de protéines anti-apoptotiques (H. Lee et al., 2002; Sabbagh et al., 2008) et dans la voie de signalisation de l'IL-2 (Croft, 2003; Gaffen, 2001; Redmond, Weinberg, Charbonneau, Gough, & Ratliff, 2007) (*Figure 10*).



**Figure 10 : Voie de signalisation des TNFR**

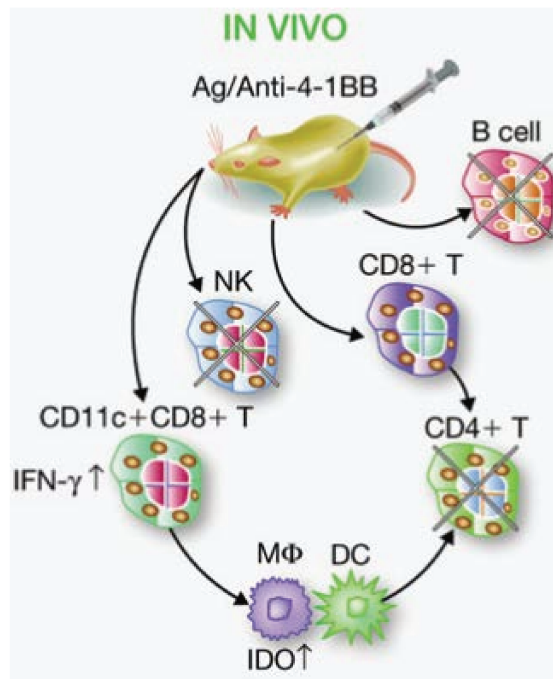
From Croft, *Co-stimulatory members of the TNFR-family, keys to effective T-cell immunity* Nature Reviews immunology 2003

## Fonctions de CD137

Les premières expériences menées *in vitro* sur des cellules spléniques murines et des cellules du sang périphérique de donneur sains ont indiqué que l'interaction de CD137 avec son ligand augmente l'expression de CD25 et la production d'IL-2 par les LT CD8<sup>+</sup> activés. Ainsi, l'engagement de CD137 à la surface des LT activés par le TCR favorise leur expansion clonale, leur différenciation en cellules effectrices cytotoxiques et leur survie (J. C. Hurtado, Kim, & Kwon, 1997; J. Hurtado, Kim, & Kwon, 1995; Laderach, Movassagh, Johnson, Mittler, & Galy, 2002; Shuford et al., 1997; Wen, Bukczynski, & Watts, 2002). Au vu du rôle de CD28 dans l'uprégulation de l'expression des TNFR, les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> sont d'autant plus importantes en combinant la costimulation de CD28 et CD137 (Melero et al., 1998; Wen et al., 2002). Le rôle antitumoral de CD137 a été caractérisé *in vivo* dans divers modèles de cancers. Ces travaux ont mis en évidence que la stimulation de CD137 via l'administration d'un anticorps agoniste chez des souris porteuses de tumeurs (mastocytomes P815, thymomes EG7, myélome multiple Vk\*Myd, mélanome métastatique B16F10) augmente le nombre de LT CD8<sup>+</sup> sécrétant de l'IFN- $\gamma$  au site de la tumeur (Guillerey et al., 2015; Ju et al., 2005; Lin et al., 2010; Melero et al., 1997). Les conditions hypoxiques du microenvironnement tumoral semblent jouer un rôle important dans l'augmentation de l'infiltrat lymphocytaire au site tumoral. En effet, l'hypoxie favorise l'expression de CD137 à la surface des cellules endothéliales qui recrutent davantage les LT CD8<sup>+</sup> au site tumoral en augmentant l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 (Palazon et al., 2011). La stimulation du CD137 est donc associée à une augmentation du rejet de la tumeur, un retard de sa progression et une survie prolongée des souris (Guillerey et al., 2015; Ju et al., 2005; Lin et al., 2010; Melero et al., 1997). Cependant, des expériences de transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un antigène tumoral (P1A) chez des souris RAG-2<sup>-/-</sup> injectées avec des plasmocytes malins exprimant P1A (J558) puis traitées avec l'anti-CD137 ont révélé que le rôle protecteur de CD137, indépendant de l'activité des LT CD4<sup>+</sup> *helper*, ne consiste pas à augmenter de la prolifération LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur mais à maintenir leur survie pour mieux contrôler la croissance tumorale (May, Chen, Zheng, & Liu, 2002). D'autres études ont indiqué que CD137 n'est pas nécessaire à la génération de LT CD8<sup>+</sup> effecteurs dans les phases précoces de la réponse immunitaire antitumorale mais contribue davantage au développement de LT CD8<sup>+</sup> mémoires cytotoxiques impliqués dans la régression

de nombreuses tumeurs dans les phases plus tardives (Miller et al., 2002; Willoughby et al., 2014).

Bien que la stimulation CD137 potentialise les réponses antitumorales effectrices des LT CD8<sup>+</sup>, des études ont mis en évidence le « double rôle » immunorégulateur de CD137 dans l'inhibition de la progression de maladies auto-immunes (modèles pré-cliniques de sclérose en plaque, de polyarthrite rhumatoïde et de lupus érythémateux disséminé) et la réduction de leur sévérité (Seo et al., 2004; Y. Sun, Chen, et al., 2002; Y. Sun, Lin, et al., 2002). La stimulation du CD137 génère une population de LT CD8<sup>+</sup> régulateurs (caractérisés par l'expression de CD11c) qui en réponse à l'IFN- $\gamma$ , sécrètent du TGF- $\beta$  (Myers et al., 2005). Le TGF- $\beta$  stimule la production d'autres facteurs immunosuppresseurs (IDO) par les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques et les macrophages qui inhibent les fonctions des LT CD4<sup>+</sup> et induisent l'apoptose des lymphocytes B auto-réactifs (Figure 11).



**Figure 11 :** Effets de l'anti-CD137 sur les médiateurs de la réponse immunitaire in vivo

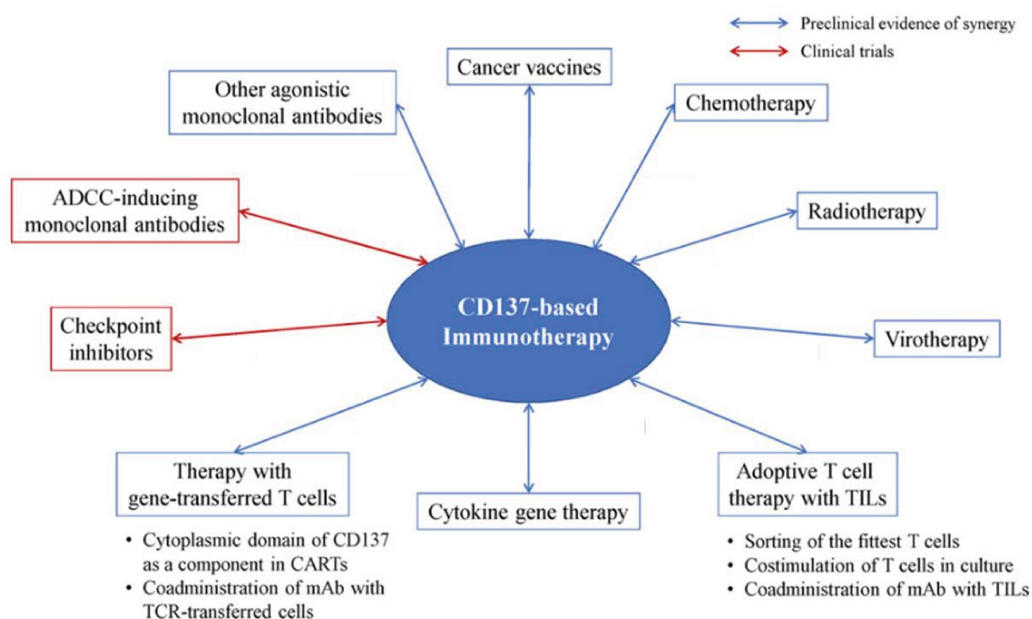
From D.Vinay and B.Kwon, *Immunotherapy of Cancer with 4-1BB*, *Molecular Cancer Therapeutics* 2012

La stimulation de CD137 conduit à de multiples effets immunorégulateurs in vivo, notamment la diminution du nombre et des fonctions des lymphocytes B via un mécanisme dépendant des LT. Bien que ce mécanisme soit encore mal défini, les études suggèrent que l'anti-CD137 augmente la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T. L'IFN- $\gamma$  serait à l'origine de l'augmentation du nombre et de l'activité des macrophages qui conduirait à la délétion des LT CD4<sup>+</sup> helper et donc à l'augmentation de l'apoptose des lymphocytes B.

### Stratégies thérapeutiques

Bien que le traitement anti-CD137 parvienne à contrôler la croissance tumorale dans de nombreux modèles murins, Wilcox et al ont démontré que certaines tumeurs faiblement immunogéniques ne répondent pas au traitement (Wilcox et al., 2002). La tumeur C3 (tumeur épithéliale exprimant le peptide oncogénique E7 de l'HPV) « échappe » aux fonctions cytolytiques des LT CD8<sup>+</sup> qui ne parviennent pas à être suffisamment activés pour répondre à la stimulation du CD137 *in vivo* (Wilcox et al., 2002). Ainsi, il a été révélé qu'une immunisation des souris avec les peptides oncogéniques est nécessaire à l'activité antitumorale de l'anti-CD137 pour diminuer la taille de tumeurs établies et augmenter la survie des souris (Wilcox et al., 2002). Ces observations ont conduit les auteurs à supposer qu'au vu de la faible expression des molécules du CMH-I à la surface des tumeurs peu immunogéniques, la quantité des interactions TCR : CMH-I : peptide n'est pas suffisante pour atteindre le seuil d'activation nécessaire à l'activation des LT CD8<sup>+</sup>. Ainsi, il semblerait que l'activation primaire défectueuse est à l'origine de l'incapacité des LT CD8<sup>+</sup> à répondre aux signaux de costimulation issus de l'engagement du CD137. Cependant, des travaux ont indiqué qu'en fonction du site anatomique dans lequel les tumeurs faiblement immunogéniques progressent (MCA205 et GL261), les LT CD8<sup>+</sup> sont plus ou moins capables de répondre au traitement anti-CD137 (J. A. Kim et al., 2001) : les tumeurs sous-cutanées ou métastatiques sont résistantes au traitement anti-CD137 tandis que les tumeurs intracrâniennes sont efficacement contrôlées par les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène. Il a par ailleurs été indiqué que les stratégies d'immunisation avec les peptides tumoraux E7 ou TRP-2 augmente la survie des souris porteuses de tumeurs peu immunogéniques tels que le carcinome du poumon T1 et le mélanome B16F10, respectivement (Wilcox et al., 2002). Une autre stratégie d'immunisation consiste à injecter les souris avec des cellules tumorales exprimant les facteurs de croissance Flt3-L (Flt3-Ligand) ou GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) ainsi que des adénovirus codant l'IL-12. Ces trois facteurs solubles jouent un rôle majeur dans l'activation des DC et donc dans les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> (B. Li, Lin, Vanroey, Jure-kunkel, & Jooss, 2007; Miller et al., 2002; Murillo et al., 2009).

Ainsi, il a été mis en évidence que la co-administration de l'anti-CD137 et de cellules tumorales B16 exprimant Flt3L (vaccin thérapeutique FVAX), GM-CSF (vaccin thérapeutique GVAX) ou encore d'adénovirus codant pour l'IL-12 augmente sensiblement la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> effecteurs infiltrant les tumeurs, retarde la croissance tumorale et améliore la survie des souris porteuses de mélanome (modèle B16-F10) (Curran et al., 2013; Curran, Kim, Montalvo, Alshamkhani, & Allison, 2011; B. Li et al., 2007; D. Xu et al., 2004). La combinaison de l'anti-CD137 avec l'agent chimiothérapeutique 5-Fu (5-fluorouracile) s'est également avérée très efficace dans le traitement du carcinome rénal (connu pour sa résistance aux traitements conventionnels anti-cancéreux) où il a été mis en évidence dans un modèle pré-clinique qu'elle augmente le nombre de LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs et conduit à l'éradication de la tumeur chez 70% des souris traitées (Ju et al., 2008). Malgré la toxicité du traitement anti-CD137 utilisé en monothérapie identifiée dans des modèles pré-cliniques (S. Chen et al., 2015; Niu et al., 2007) et chez des patients atteints de cancers avancés (Segal et al., 2017; Sznol et al., 2008), des stratégies immunothérapeutiques basées sur la combinaison de l'anti-CD137 avec d'autres traitements anti-cancéreux sont actuellement développées dans des essais cliniques (*Figure*



**Figure 12 :** Ensemble des différentes stratégies immunothérapeutiques basées sur l'injection d'un anticorps monoclonal anti-CD137

Modified from Sanchez-Paulete et al, *Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy*, *The European Journal of Immunology* 2016

12).

Chez des patients atteints de mélanome, la surexpression de CD137 à la surface de LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs métastatiques suggère fortement que CD137 est une cible majeure des traitements immunothérapeutiques (Baitsch et al., 2011). L'anticorps humanisé anti-CD137, l'Urelumab (BMS-663513), est principalement utilisé dans de nombreux essais cliniques en combinaison avec des anticorps ciblant les récepteurs inhibiteurs des LT CD8<sup>+</sup> CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-Associated protein 4) et PD-1 (Programmed cell Death-1). La caractérisation de ces récepteurs inhibiteurs ainsi que les différentes combinaisons thérapeutiques avec les ICB (Immune Checkpoint Blokade) fera l'objet d'une description détaillée dans une prochaine partie du manuscrit.

#### (4) GITR et OX40

##### GITR

GITR (AITR ou TNFRSF18) est un récepteur transmembranaire appartenant à la superfamille des TNFR qui interagit avec son ligand GITR-L (GITR-Ligand) principalement exprimé par les CPA (cellules B, macrophages et cellules dendritiques). Initialement identifié chez la souris (Nocentini et al., 1997) puis chez l'Homme (Gurney et al., 1999), GITR est impliqué dans l'inhibition de l'apoptose des lymphocytes T via l'activation du facteur de transcription anti-apoptotique NFκB. Les propriétés structurales et fonctionnelles des TNFR étant relativement identiques, une éventuelle redondance de leurs rôles respectifs a suggéré que GITR n'est pas nécessaire à la différenciation effectrice des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> au cours des phases précoces du « priming ». Cependant, la stimulation de GITR costimule le signal TCR des LT CD8<sup>+</sup> en augmentant leur prolifération et leurs fonctions effectrices (sécrétion d'IFN-γ) via la voie des MAPK (Ronchetti et al., 2004; Stephens et al., 2004).

Il a ainsi été démontré *in vivo* que l'injection d'un anticorps agoniste anti-GITR (DTA-1) chez des souris porteuses de tumeurs solides telles que le mélanome (modèle B16) (Ramirez-Montagut et al., 2006), le fibrosarcome (lignée tumorale MethA) ou encore le carcinome rénal (lignée tumorale Colon 26) (Ko et al., 2005) augmente l'activation des LT CD8<sup>+</sup> et conduit à l'élimination presque totale de la tumeur. GITR étant exprimé de façon prépondérante par les LT<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>, les mécanismes anti-tumoraux de l'anti-GITR sont également associés à la réduction de leurs fonctions immunosuppressives (Shimizu, Yamazaki, Takahashi, Ishida, & Sakaguchi, 2002) ainsi qu'à la diminution de leur infiltration au site de la tumeur (Cohen et al., 2010; Ko et al., 2005).

Dans le modèle expérimental de mélanome (modèle B16F10), il a notamment été indiqué que la réduction de l'infiltration intra-tumorale des  $LT_{reg} CD4^+$  induite par le traitement précoce des souris malades avec l'anti-GITR favorise l'infiltration de  $LT CD8^+$  aux fonctions cytotoxiques augmentées (Zappasodi et al., 2019). Cependant, le seul traitement anti-GITR dans des stades plus avancés de la maladie ne conduit pas à une réponse clinique aussi bien chez l'Homme que chez la souris (Zappasodi et al., 2019). Divers modèles murins précliniques (cancer de l'ovaire ID8, mélanome B16F10 et carcinome mammaire 4T1) ont permis de mettre en évidence que la combinaison synergique de l'anti-GITR et d'un anticorps bloquant le récepteur inhibiteur PD-1 (anti-PD-1/GITR) potentialise les fonctions cytolytiques des  $LT CD8^+$  et induit une réponse immunitaire mémoire à long terme (Lu et al., 2014). Ainsi, la co-administration des deux anticorps diminue la taille de la tumeur et améliore la survie de souris. Cette stratégie thérapeutique est actuellement en cours d'investigation chez des patients atteints de tumeurs réfractaires avancées (Zappasodi et al., 2019).



## OX40

OX40 (CD134) est également un TNFR transitoirement exprimé à la surface des LT CD8<sup>+</sup> activés par le TCR qui interagit avec son ligand OX40-L (OX40-Ligand) principalement exprimé par les CPA. Suite à cette interaction, les LT CD8<sup>+</sup> proliférants expriment davantage CD25 et produisent plus d'IL-2 afin de maintenir leur survie au cours des phases précoces de la réponse immunitaire (Bansal-Pakala, Halteman, Cheng, & Croft, 2004). Suite à l'identification de LT CD8<sup>+</sup> exprimant OX40 au sein de tumeurs de patients atteints de cancer (cancer du sein, mélanome, cancer du cou et de la tête) (Vetto et al., 1997; Weinberg et al., 2000), le rôle de OX40 a été caractérisé *in vivo* dans de nombreux modèles pré-cliniques de cancers (mélanome, cancer du poumon, cancer du côlon, lymphome, cancer de la prostate, sarcomes, gliomes). Il a ainsi été démontré que la stimulation de OX40 augmente la prolifération et les fonctions cytotoxiques de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène tumoral et qu'elles sont associées à une diminution sensible de la taille des tumeurs et une augmentation de la survie des souris (Andarini et al., 2004; Bansal-Pakala et al., 2004; Kjærsgaard et al., 2000; Redmond et al., 2007; Weinberg et al., 2000). En effet, l'administration d'un anticorps agoniste anti-OX40 favorise l'infiltration des LT CD8<sup>+</sup> au site de la tumeur et conduit à la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire à long terme. Cependant, l'accumulation des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs au site tumoral dépend de la présence des LT CD4<sup>+</sup> pro-inflammatoires (LT CD4<sup>+</sup> TH1) et l'effet thérapeutique de l'anti-OX40 n'est efficace que dans le traitement de tumeurs hautement immunogéniques (Andarini et al., 2004; Kjærsgaard et al., 2000). Ainsi, l'investigation de l'effet de la combinaison d'anticorps agoniste anti-OX40 et anti-CD137 sur la réponse immunitaire antitumorale a permis de caractériser davantage les rôles respectifs des LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> (S.-J. Lee et al., 2004). Cette étude a révélé que la stimulation des deux récepteurs potentialise l'accumulation des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs au sein des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes et que leur survie dépend de la présence des LT CD4<sup>+</sup>.

### 3. Fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup>

Les LT CD8<sup>+</sup> ayant été activés dans les ganglions lymphatiques migrent en périphérie pour reconnaître et éliminer cellules tumorales. Leur reconnaissance via l'interaction TCR / CMH-I :peptide déclenche l'activation des mécanismes qui induisent la mort des cellules tumorales : l'exocytose des granules cytotoxiques et l'apoptose induite par les récepteurs de morts (Barry & Bleackley, 2002).

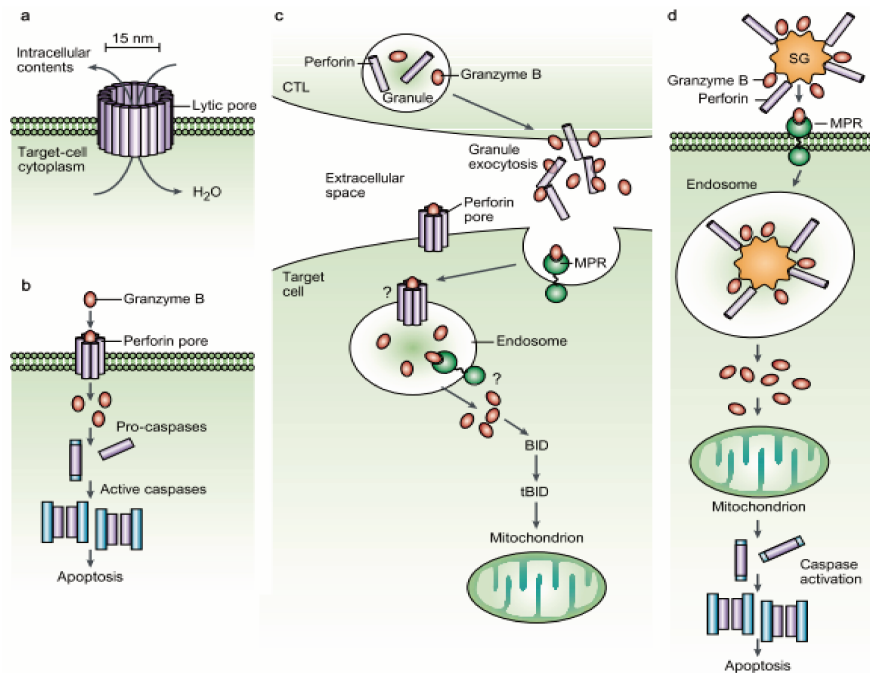
#### a) *Fonctions cytotoxiques*

##### (1) La voie de mort par exocytose

##### La perforine et la granzyme

Les LT CD8<sup>+</sup> possèdent dans leur cytoplasme des granules cytotoxiques qui contiennent différentes protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose des cellules cibles. Les protéines les plus abondamment trouvées dans ces granules sont les granzymes ( sérines protéases) et la perforine. Suite à la stimulation du TCR, les granules se clusterisent et se polarisent au niveau de la synapse immunologique (Grakoui et al., 1999; Ritter et al., 2015). L'exocytose des granules s'effectue très rapidement après la reconnaissance de la cellule cible et conduit au relarguage des molécules lytiques qui conduisent à l'apoptose de cellule cible. Des modèles expérimentaux de lymphomes et de sarcome ont notamment pu mettre en évidence *in vivo* le rôle protecteur de la perforine sécrétée par les LT CD8<sup>+</sup> contre la croissance tumorale (M J Smyth et al., 2000). La granzyme B est sans doute la granzyme la plus connue puisqu'elle active par protéolyse les caspases intracellulaires qui induisent l'apoptose de la cellule tumorale. La granzyme A est la protéase la plus abondante au sein des granules lytiques dont les fonctions apoptotiques ne dépendent pas des casapses. Elle est cependant capable d'endommager l'ADN de la cellule cible par de nombreux moyens. Elle est à l'origine d'une perturbation du métabolisme mitochondrial qui génère des espèces réactives de l'oxygène ( ROS , Reactive Oxygen Species) altérant la structure de l'ADN. Les dommages à l'ADN peuvent également résulter de la dégradation de la laminine qui maintient la structure de l'enveloppe nucléaire, ou résulter de la dégradation des histones et des protéines de réparation de l'ADN (Lieberman, 2010).

Différents mécanismes d'actions respectifs de la perforine et des granzymes ont été proposés (Figure 13). Le premier modèle stipule que la perforine se polymérise à la membrane plasmique de la cellule cible pour former des pores nécessaires à l'entrée passive des granzymes (Figure 13 a et b). Au vu de plusieurs études qui ont démontré que les granzymes pénètrent dans la cellule en absence de perforine, les autres modèles consistent à dire que les granzymes sont incorporées dans la cellule cible par endocytose (Pinkoski et al., 1998) (Figure 13 c) ou encore que des complexes macromoléculaires contenant la perforine et les granzymes sont reconnus par les récepteurs mannose 6-phosphate ( MPR) puis encapsidés dans des endosomes (Figure 13 d) (Metkar et al., 2002). Cette hypothèse a été confirmée dans une étude qui a démontré que la perforine et la granzyme agissent en synergie et de façon relativement rapide en fonction de l'activité des endosomes (Lopez et al., 2013).



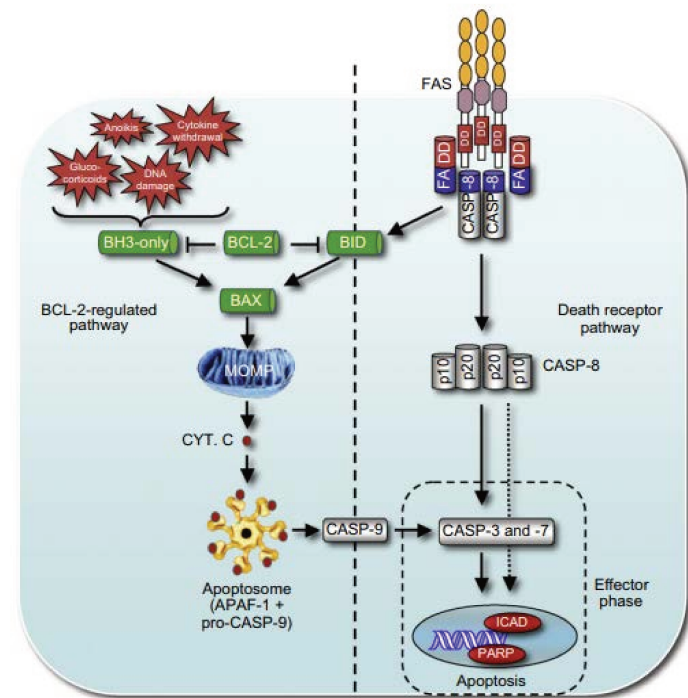
**Figure 13** : Modèles d'action respectives de la perforine et de la granzyme B dans l'induction de l'apoptose de la cellule cible

From Joseph A. Trapani and Mark J. Smyth, *Functional significance of the Perforin/Granzyme cell death pathway* Nature Reviews Immunology 2002

(2) La voie de mort par les récepteurs de mort

La voie Fas : Fas-L et la voie TRAIL : TRAIL-L

Les LT CD8<sup>+</sup> activés par le TCR sont également capables d'induire l'apoptose de la cellule tumorale via l'interaction entre le ligand Fas-L (CD95-L) et le récepteur de mort Fas (APO-1, CD95) exprimé à la surface de la cellule cible. Bien que la forme membranaire trimérique de Fas-L soit la plus fonctionnellement active, elle peut cependant être clivée par une métalloprotéase pour générer une forme soluble cytokinique, active uniquement chez l'Homme (Tanaka et al., 1996). L'interaction Fas/ Fas-L conduit au recrutement du complexe protéique DISC ( Death-Inducing Signaling Complex) au niveau de Fas. Ce complexe, constitué de la protéine adaptatrice FADD et de la caspase-8, conduit à l'apoptose de la cellule cible par deux mécanismes différents (Strasser, Jost, & Nagata, 2009). Dans un premier cas, la caspase 8 active les caspases 3 et 7 qui cliveront de multiples protéines vitales pour la survie de la cellule. Dans un second cas, la caspase 8 active la voie de la protéine BID qui conduit à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et au relargage du cytochrome c impliqué dans la formation de



**Figure 14 :** La voie Fas-L/Fas induit l'apoptose par deux mécanismes différents

From A. Strasser et al, *The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System* *Immunity* 2009

l'apoptosome

(Figure

14).

La voie TRAIL/ TRAIL-L est également une voie de mort impliqué dans les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup>. Elle consiste de façon très similaire à elle de Fas/ Fas-L à activer la voie des caspases pour induire l'apoptose de la cellule cible (Holoch & Griffith, 2009).

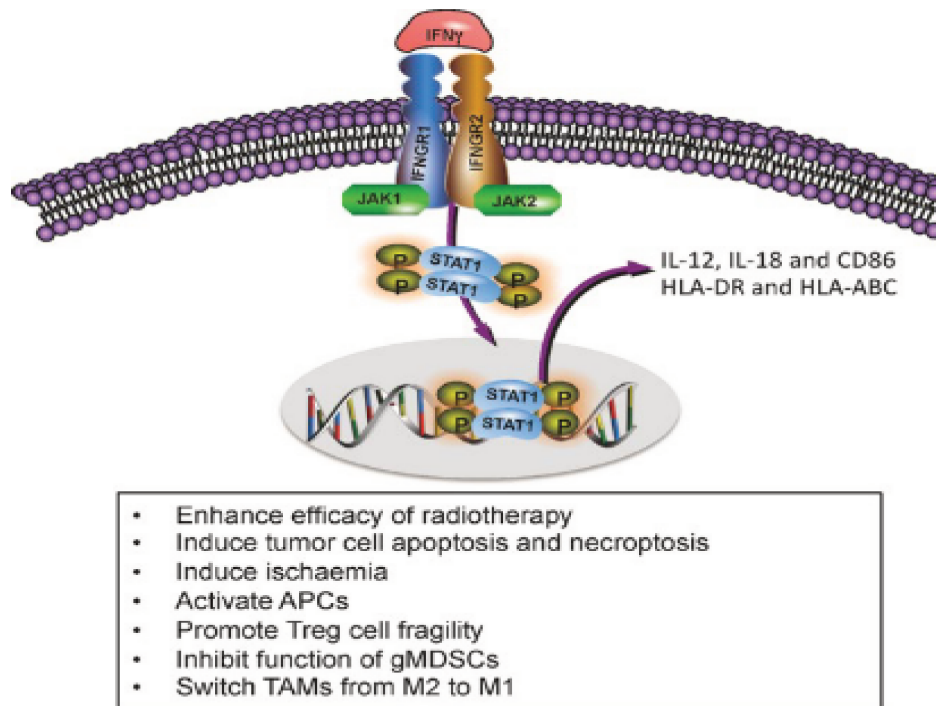
b) *Sécrétion de cytokines*

(1) L'IFN- $\gamma$

L'IFN- $\gamma$  est une cytokine pro-inflammatoire appartenant à la famille des IFNs de type II jouant un rôle majeur dans les propriétés antitumorales des LT CD8<sup>+</sup>. L'IFN- $\gamma$  est sécrétée par les LT CD8<sup>+</sup> activés par le TCR et interagit avec son récepteur IFNGR1 exprimé par les cellules tumorales. Suite à cette interaction, le facteur de transcription STAT1 active la transcription des gènes codant les protéines anti-prolifératives et inhibe celle des gènes codant les protéines du cycle cellulaire (cyclines) à l'origine de l'apoptose des cellules tumorales (Ni & Lu, 2018). Des modèles de tumorigénèse primaire ont ainsi permis de démontrer *in vivo* que l'IFN- $\gamma$  est nécessaire au contrôle de la croissance tumorale et à l'inhibition de la formation de métastases (Dighe, Richards, Old, & Schreiber, 1994; Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001; Street et al., 2001).

L'IFN- $\gamma$  favorise l'activation indirecte des LT CD8<sup>+</sup> en augmentant les propriétés de présentation antigénique des DC et facilite également la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales via l'augmentation de l'expression du CMH-I et du récepteur Fas à la surface, respectivement (*Figure 15*) (Castro, Cardoso, Gonçalves, Serre, & Oliveira, 2018; McKenzie, Mark DThomas et al., 2006). Par ailleurs, il a été indiqué que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup> agit de façon autocrine pour augmenter leurs fonctions cytotoxiques (Bhat, Leggatt, Waterhouse, & Frazer, 2017). De plus, l'IFN- $\gamma$  agit directement sur les cellules endothéliales afin de diminuer la taille des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur, contribuant ainsi à la régression tumorale par ischémie (Kammertoens et al., 2017). Enfin, l'IFN- $\gamma$  peut contribuer au contrôle de la croissance tumorale en limitant les fonctions des cellules aux propriétés immunosuppressives telles que les MDCS ( Myeloid-derived suppressor cells) et les LTreg (Delgoffe et al., 2017; Médina-Echeverz, Wideman, Zautra, & Edwards, 2014).

En effet, des travaux réalisés chez la souris ont suggéré que l'IFN- $\gamma$  diminue l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2a1 des MDSCs (Médina-Echeverez et al., 2014) et qu'il contribue à « fragiliser » certains LTreg n'exprimant pas certaines protéines nécessaires à leurs fonctions



**Figure 15 :** Rôles de l'IFN- $\gamma$  dans l'immunosurveillance

From Ni and Lu, *Interferon gamma in cancer immunotherapy* Cancer Medicine Review 2018

Bien que l'IFN- $\gamma$  inhibe directement la prolifération des cellules tumorales et induit leur apoptose, les signaux « précoces » issus du signaling de l'IFN- $\gamma$  agissent sur les cellules du système immunitaire. Ils conduisent notamment à la production d'IL-12 et d'IL-18 par les CPA et à l'augmentation de l'expression de la molécule de costimulation CD86 à leur surface pour favoriser la différenciation des LT<sub>TH1</sub> CD4<sup>+</sup> et l'activation des LT CD8<sup>+</sup>. L'activation des fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> est également favorisée par l'IFN- $\gamma$  puisqu'il conduit à l'augmentation de l'expression des molécules du CMH-I à la surface des APC et des cellules tumorales.

(NRP1 et l'ubiquine ligase E3 VHL) (Delgoffe et al., 2017; J. H. Lee, Elly, Park, & Liu, 2015).

## (2) Le TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  (Tumour necrosis factor) est une glycoprotéine de type II capable d'induire des signaux intracellulaires via sa forme transmembranaire ou sa forme soluble issue du clivage protéolytique de la forme membranaire, sécrétée par de nombreux cellules immunitaires (monocytes, macrophages, mastocytes, lymphocytes T). Le TNF- $\alpha$  interagit avec les récepteurs ubiquitaires TNFR1 (p55) et TNFR2 (p75) afin d'induire la transduction de signaux impliqués dans l'activation, la prolifération et la survie cellulaire. Bien que le TNF- $\alpha$  soit impliqué dans l'activation des LT CD8<sup>+</sup> (Calzascia et al., 2007; Trevejo et al., 2001) et qu'il favorise leur l'extravasation vers le site de l'inflammation (Sata & Walsh, 1998), la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les LT CD8<sup>+</sup> permet également d'augmentation leurs fonctions cytotoxiques.

Après avoir identifié le rôle clé du TNF- $\alpha$  dans les fonctions antitumorales des LT CD8<sup>+</sup> chez des souris immunodéficientes TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> (Prevost-Blondel, Roth, Rosenthal, & Pircher, 2000), un modèle expérimental du cancer du pancréas (RIP[GP  $\times$  Tag2]) a en effet démontré que le TNF- $\alpha$  interagit avec TNFR2 exprimé par les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs afin d'induire leur production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Calzascia et al., 2007; Speiser et al., 1997). L'action autocrine du TNF- $\alpha$  augmente la prolifération et les fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur (Calzascia et al., 2007; Prevost-Blondel et al., 2000). La caractérisation du rôle du TNF- $\alpha$  sur les fonctions des LT CD8<sup>+</sup> *ex-vivo* a confirmé que le TNF- $\alpha$  réduit le seuil d'activation des LT CD8<sup>+</sup> en augmentant leur production d'IL-2 et qu'il favorise leur survie en augmentant l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-xl et Bcl-2 (E. Y. Kim & Teh, 2001, 2004). Conformément à certains travaux ayant démontré que le TNF- $\alpha$  exogène augmente l'expression de Fas à la surface des LT CD8<sup>+</sup> pour favoriser l'apoptose des cellules cibles exprimant Fas-L (Kafrouni, Brown, & Thiele, 2003), il a été suggéré que l'interaction entre TNF- $\alpha$  et TNFR2 régule positivement l'expression de Fas.

Malgré le rôle activateur des fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup>, le TNF- $\alpha$  possède également un rôle pro-tumoral. Au vu de l'expression ubiquitaire des récepteurs aux TNF- $\alpha$ , le TNF- $\alpha$  interagit avec TNFR2 exprimé par les MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells) et les LTreg afin de potentialiser leurs fonctions immunosuppressives et le maintien de leur survie (X. Chen et al., 2007; X. Zhao et al., 2012). Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence dans le modèle

expérimental de mélanome B16K1 que le TNF- $\alpha$  interagit avec son récepteur TNFR1 exprimé par les LT CD8<sup>+</sup> afin d'inhiber leur accumulation au site tumoral (Bertrand et al., 2015).

Malgré les rôles pro-tumoraux et antitumoraux du TNF- $\alpha$ , le blocage de la voie du TNF- $\alpha$  reste donc une stratégie thérapeutique intéressante dans le traitement du mélanome (Bertrand, Rochotte, Levade, & Segui, 2016). En effet, une étude récente a démontré que l'administration d'un anticorps antagoniste anti-TNF- $\alpha$  dans des souris porteuses de mélanome (B16-OVA) ou du cancer du côlon (MC38-OVA) potentialise les effets antitumoraux des immunothérapies bloquant les récepteurs inhibiteurs des LT CD8<sup>+</sup>, PD-1 et CTLA-4 (Perez-Ruiz et al., 2019).

#### 4. Génération des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs et des LT CD8<sup>+</sup> mémoires

##### a) *Sous-types de LT CD8<sup>+</sup> mémoires*

L'activation et l'expansion clonale des LT CD8<sup>+</sup> sont des processus dynamiques qui conduisent à une différenciation des LT CD8<sup>+</sup> en cellules effectrices et en cellules mémoires. Les LT CD8<sup>+</sup> mémoires sont caractérisés par leur à longue durée de vie et leurs capacités à être réactivées rapidement et efficacement en réponse à une stimulation antigénique ultérieure (Williams & Bevan, 2007). Les études sur la génération, la localisation et les fonctions des LT CD8<sup>+</sup> mémoires ont majoritairement été réalisées sur des modèles d'infections chez la souris. Les LT CD8<sup>+</sup> mémoires sont phénotypiquement identifiés selon l'expression de la sélectine CD62L et du récepteur de chimiokine CCR7 qui leur confèrent des localisations anatomiques spécifiques (Sallusto, Lenig, & Förster, 1999).

##### Les LT CD8<sup>+</sup> centraux mémoires

L'expression de CCR7 par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> centraux mémoires LT<sub>CM</sub> (central memory) favorise leur recrutement au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLS) en interagissant avec les chimiokines CCL19 et CCL21 sécrétées par les cellules stromales des zones T. L'expression de la sélectine CD62-L par les LT<sub>CM</sub> favorise leur « rolling » le long des HEV (High endothelial venules) avant de migrer à travers la barrière endothéliale (phénomène de diapédèse). Il a par ailleurs été démontré que les chimiokines CCL21 et CCL19 sont exprimées par les cellules endothéliales des HEV et permettent aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de migrer plus efficacement vers les ganglions lymphatiques (Baekkevold et al., 2001). Les LT<sub>CM</sub> CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>



recirculent entre les différents OLS et sont capables de proliférer rapidement en réponse à une stimulation antigénique ultérieure via leur production d'IL-2.

#### Les LT CD8<sup>±</sup> effecteurs mémoires

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs mémoires LT<sub>EM</sub> (effector memory) (CD62L<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> chez l'Homme et CD62L<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> chez la souris) sont localisés dans le sang et les organes non lymphoïdes.

Les LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> expriment le récepteur aux chimiokines CXCR3 qui leur permet de migrer au site tumoral au sein desquels ils sécrètent rapidement des cytokines effectrices et des molécules cytolytiques en réponse à la stimulation du TCR (Sallusto et al., 1999). Contrairement aux LT<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup>, les LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> sont considérés comme des cellules à un stade très différencié aux fonctions effectrices importantes mais aux faibles capacités prolifératives.

#### Les LT CD8<sup>±</sup> effecteurs mémoires terminaux

Les lymphocytes T effecteurs mémoires terminaux (LT<sub>EMRA</sub>) CD62L<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> (inexistants chez la souris) possèdent des propriétés relativement identiques aux LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> (Willinger, Freeman, Hasegawa, McMichael, & Callan, 2005). Les LT CD8<sup>+</sup> T<sub>EMRA</sub> s'expandent peu en réponse à une stimulation antigénique et sont relativement sensible à l'apoptose dû à leur faible expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Geginat et al., 2003).

#### Les LT CD8<sup>±</sup> résidents mémoires

Les lymphocytes T « résidents mémoires » (LT<sub>RM</sub>) sont des LT CD8<sup>+</sup> mémoires non circulants qui résident spécifiquement dans les tissus non lymphoïdes périphériques (Mami-Chouaib et al., 2018). Les LT<sub>RM</sub> représentent la population majoritaire de LT CD8<sup>+</sup> mémoires dans les tissus épithéliaux dont la peau, les intestins, les poumons et le système nerveux (Steinert et al., 2015). La rétention des LT<sub>RM</sub> dans les tissus résulte principalement de l'expression de l'intégrine CD103 ( $\alpha_E\beta_7$ ) à la surface, qui interagit avec la cadhérine E exprimée par les cellules épithéliales (Cepek, Parker, Madara, & Brenner, 1993). L'intégrine CD49 ( $\alpha_1\beta_1$ ) et la lectine de type C CD69 sont également impliquées dans la rétention des LT<sub>RM</sub> CD8<sup>+</sup> dans les tissus. Les LT<sub>RM</sub> CD8<sup>+</sup> ont des propriétés cytotoxiques accrues impliquées dans la protection contre les infections et les maladies inflammatoires chez l'Homme. L'analyse des LT<sub>RM</sub> présents sur la barrière épithéliale du poumon chez des donneurs sains a indiqué que les LT<sub>RM</sub> CD8<sup>+</sup> sont des lymphocytes

mémoires qui possèdent une signature transcriptomique spécifique associée à leurs propriétés d'adhésion, leurs propriétés effectrices et leur survie à long terme (Hombrink et al., 2016).

*b) Rôle antitumoral des différentes populations mémoires*

Cette classification des populations des LT mémoires a conduit les chercheurs à évaluer quelles étaient les populations aux propriétés antitumorales effectives. Malgré leurs fonctions cytolytiques accrues et leur capacité à produire beaucoup d'IFN- $\gamma$  *in vitro*, les LT<sub>EM</sub> sont moins efficace que les LT<sub>CM</sub> à contrôler la croissance tumorale *in vivo*. En effet, des expériences de transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène tumoral gp100 issus de souris transgéniques Pmel, différenciés en LT<sub>CM</sub> *in vitro* puis injectés chez des souris porteuses de mélanome (B16) ont révélé que les LT<sub>CM</sub> possèdent des propriétés antitumorales supérieures au LT<sub>EM</sub> conduisant à la régression tumorale (Klebanoff et al., 2005). L'état peu différencié et prolifératif des LT<sub>CM</sub>, ainsi que leurs capacités à migrer et résider au sein des ganglions lymphatiques semblent être des caractéristiques nécessaires à la génération d'une réponse effectrice antitumorale (Gattinoni et al., 2005; Klebanoff et al., 2005). Chez l'Homme et chez la souris, une nouvelle population unique de lymphocytes T mémoires au phénotype de LT naïfs a été identifiée comme étant la population mémoire la moins différenciée. Les analyses phénotypiques et fonctionnelles de cette population ont mis en évidence que ces LT ont des propriétés de cellules souches, capables de s'autorenouveler, de proliférer intensément en réponse aux cytokines homéostatiques IL-15 et IL-7 et de sécréter des cytokines effectrices en réponse à une stimulation du TCR *in vitro* (Gattinoni et al., 2009, 2011). Ces LT<sub>SCM</sub> (Stem-cell memory T cells) possèdent programme génétique unique qui semble indiquer qu'ils sont issus de la différenciation des LT<sub>N</sub> et qu'ils se différencieront de façon linéaire en LT<sub>CM</sub> puis en LT<sub>EM</sub> (LT<sub>N</sub> → T<sub>SCM</sub> → T<sub>CM</sub> → T<sub>EM</sub>). Afin d'évaluer le rôle des LT<sub>SCM</sub> dans l'immunosurveillance antitumorale, des souris immunodéficientes NSG (NOD Scid Gamma) porteuses de tumeur mésothéliale (M108) ont été injectées avec les différentes populations spécifiques de la tumeur. Les observations issues de ces travaux indiquent que les LT<sub>SCM</sub> constituent la population de LT mémoires aux propriétés antitumorales importantes ; elles sont les seules capables de conduire à une régression de la tumeur et une prolongation de la survie des souris. Ainsi, ces études suggèrent que les LT<sub>SCM</sub> ont des capacités thérapeutiques plus efficaces que les LT<sub>EM</sub> utilisés

dans des essais cliniques d'immunothérapies chez l'Homme (Gattinoni, Powell, Rosenberg, & Restifo, 2006).

Les  $LT_{RM} CD8^+$  constituent également des lymphocytes mémoires présents dans de nombreuses tumeurs solides aux propriétés cytotoxiques importantes (Mami-Chouaib et al., 2018). En effet, au-delà de leur conférer des propriétés d'adhésion, l'intégrine CD103 exprimée à la surface des  $LT_{RM}$  interagit avec la cadhérine E fréquemment exprimée par les cellules tumorales afin de favoriser la sécrétion de cytokines et de granules cytolytiques (Franciszkiewicz et al., 2013). Nizard et al ont mis en évidence dans un modèle pré-clinique du cancer de la tête et du cou qu'une vaccination intranasale basée sur l'injection d'un vecteur fusionné à la protéine virale E7 du virus HPV16 ( StxB-E7) favorise le développement spécifique de  $LT_{RM}$  dans les poumons à l'origine de l'inhibition de la croissance tumorale (Nizard et al., 2017). Il a par ailleurs été révélé chez des patients atteints du cancer du poumon (carcinome) que les  $LT CD8^+$  majoritairement présents dans les tumeurs expriment CD103 (Djenidi et al., 2015; Nizard et al., 2017) et qu'ils possèdent des propriétés effectrices importantes (Djenidi et al., 2015). De façon importante, de nombreux cas de cancers solides ( cancer du poumon, cancer de l'ovaire, cancer du sein et cancer de la vessie) ont mis en évidence que les  $LT_{RM} CD8^+$  sont associés à une amélioration de la survie des patients (Djenidi et al., 2015; Mami-Chouaib et al., 2018; Nizard et al., 2017). L'activité antitumorale des  $LT_{RM}$  a été caractérisée au travers d'expériences de transfert adoptif réalisées chez des souris porteuses de mélanome (Milner et al., 2017). Ces observations laissent ainsi supposer que les  $LT_{RM}$  sont des cibles thérapeutiques majeures dans le traitement du cancer chez l'Homme.

c) *Facteurs impliqués dans la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs*

Les LT CD8<sup>+</sup> naïfs représentent un pool de clones de lymphocytes T divers exprimant des TCR capables de reconnaître spécifiquement un antigène particulier, qui suite à leur activation se différencient en cellules effectrices et en cellules mémoires « protecteurs » à long terme. La caractérisation des facteurs jouant un rôle dans la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> activés est relativement peu décrite dans des contextes tumoraux et repose essentiellement sur les travaux réalisés sur des modèles murins d'infection virale.

(1) Les médiateurs cellulaires et les cytokines

La sécrétion d'IL-12 et les interférons de type I ( IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) par les DC matures sont nécessaires à l'expansion clonale des LT CD8<sup>+</sup> et au développement de leurs fonctions cytotoxiques dans les phases précoces du « priming » des LT CD8<sup>+</sup> (Curtsinger et al., 1999; Curtsinger, Valenzuela, Agarwal, Lins, & Mescher, 2005; Hochrein et al., 2001) tandis que leur persistance dans les phases tardives permet aux LT CD8<sup>+</sup> de se différencier en cellules mémoires fonctionnelles (Curtsinger, Lins, & Mescher, 2003; Mescher, Curtsinger, Casey, & Hammerbeck, 2006; Whitmire et al., 2007; Whitmire, Tan, & Whitton, 2005; Xiao, Casey, Jameson, Curtsinger, & Matthew, 2009). Différents modèles d'infection ont indiqué que la présence de LT CD4<sup>+</sup> au cours de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> est nécessaire au maintien de la survie des LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> générés afin qu'ils puissent rapidement proliférer en réponse à une stimulation antigénique secondaire (Huster et al., 2004; J. C. Sun, Williams, & Bevan, 2004). En effet, il a été suggéré qu'en présence d'IL-2, les interactions directes entre les LT CD4<sup>+</sup> helper et les LT CD8<sup>+</sup> conduisent à diminuer l'expression du récepteur de mort TRAIL à leur surface (Janssen et al., 2005; Williams, Tyznik, & Bevan, 2006).

Conformément au modèle de différenciation lymphocytaire qui stipule qu'une phase effectrice des LT CD8<sup>+</sup> n'est pas nécessaire à leur développement en cellules mémoires (Chang et al., 2007), des travaux ont indiqué que la présence prolongée des cytokines homéostatiques IL-7 et IL-15, lorsque les concentrations d'IL-2 sont faibles et en absence de tout antigène, favorise la différenciation des LT<sub>N</sub> CD8<sup>+</sup> en LT<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> (Carrio, Bathe, & Malek, 2004; Manjunath et al., 2001).

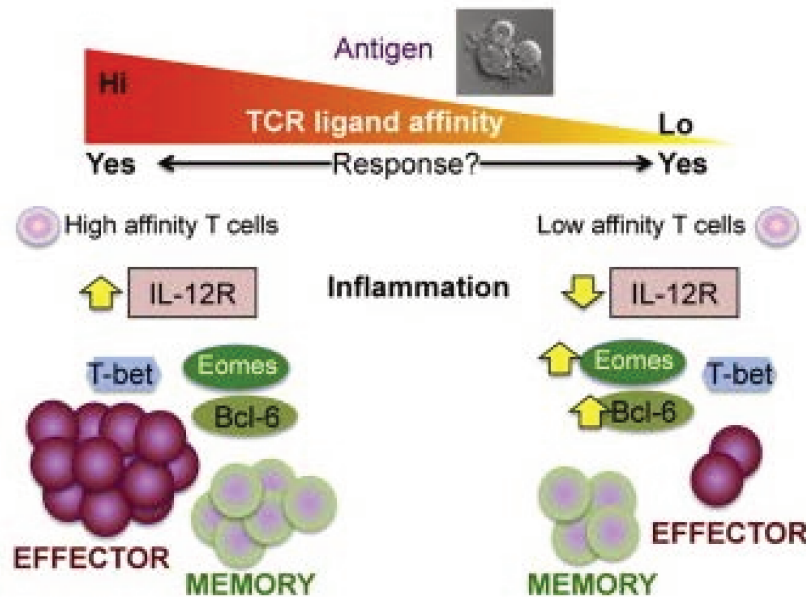
## (2) Facteurs de transcription

### Eomes et T-bet

Suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> par le TCR, les facteurs de transcription Eomesodermin (Eomes) et T-bet (Tbx21) coopèrent pour activer l'expression des protéines impliquées dans les fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs, dans leur migration au site de l'inflammation et dans l'acquisition des propriétés homéostatiques des LT CD8<sup>+</sup> mémoires (Intlekofer et al., 2005; Pearce et al., 2004; Tripathi et al., 2010). En effet, ils induisent l'expression de la perforine et granzymes, des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CXCR4 ainsi que et des récepteurs IL-2R $\beta$  et IL-15R $\beta$  nécessaires à leur prolifération et leur survie à long terme en réponse à l'IL-2 et l'IL-15. Malgré la redondance partielle des fonctions de Tbet et Eomes, la synchronisation de leurs expressions est régulée par les modalités du priming des LT CD8<sup>+</sup> et conditionnent la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> activés.

La concentration d'IL-12 et la force d'interaction entre le TCR et le CMH-I/peptide (définie par l'affinité du TCR et la quantité de peptide « loadé » par les DC) sont positivement corrélés à l'expression de Tbet qui génère préférentiellement les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs cytotoxiques à courte durée de vie (Intlekofer et al., 2005; Takemoto, Intlekofer, John, Wherry, & Reiner, 2006). Le modèle d'infection virale aiguë LCMV a mis en évidence qu'en réponse au virus LCMV, les LT CD8<sup>+</sup> activés se différencient rapidement en SLECs (Short-Lived Effector Cells) CD127<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup> destinés à disparaître rapidement (Joshi et al., 2007). En effet, le marqueur de sénescence KLRG1 est associée à une différenciation terminale des LT CD8<sup>+</sup> (Voehringer et al., 2001). Il a par ailleurs été indiqué que dans les phases précoces de l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, l'IFN- $\gamma$  agit en synergie avec l'IFN- $\alpha$  en absence d'IL-12 pour réguler positivement l'expression de Tbet et permettre ainsi aux LT CD8<sup>+</sup> naïfs d'acquérir leurs fonctions effectrices (Curtsinger, Agarwal, Lins, & Mescher, 2012). Inversement, les LT CD8<sup>+</sup> naïfs de faible affinité pour le complexe CMH-I :peptide, peu répondeurs à l'IL-12 et exprimant peu Tbet, régulent qualitativement le signal TCR afin de générer un pool de cellules mémoires à longue durée de vie CD127<sup>high</sup> exprimant Eomes, dont l'expression est proportionnelle à la dose d'antigène (Banerjee et al., 2010; Knudson, Hamilton, et al., 2013; Knudson, Goplen, Cunningham, Daniels, & Teixeira, 2013).

Ces cellules mémoires sont issues de la différenciation des MPECs  $CD127^{high}KLRG1^{low}$  aux capacités prolifératives accrues (Sarkar et al., 2008) et capables de survivre en réponse à l'IL-7 et à l'IL-15 (Joshi et al., 2007; Kaech et al., 2003; Schluns, Kieper, Jameson, & Lefrançois, 2000) Contrairement à Tbet, l'expression d'Eomes est augmentée lors de la transition des LT  $CD8^+$  effecteurs en cellules mémoires (Figure 16).



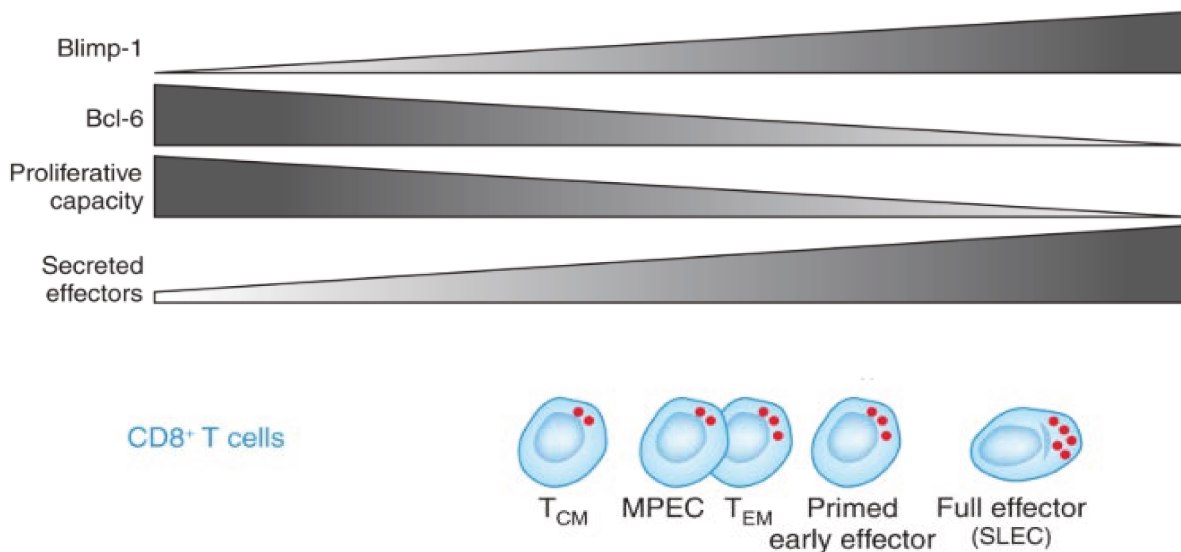
**Figure 16 :** Les modalités du priming des LT  $CD8^+$  conditionnent leur différenciation en cellules effectrices et en cellules mémoires

*Modified from Karin M. Knudson, Graphical abstract of Low-affinity T cells are programmed to maintain normal primary responses but are impaired in their recall to low-affinity ligands, Cell Reports 2013*

Le modèle murin transgénique OT-1 a mis en évidence que l'affinité du ligand conditionne le ratio des LT effecteurs/ LT mémoires et régule l'expression des facteurs de transcription Tbet et Eomes au cours d'une infection bactérienne (*Listeria Monocytogenes*). Ces analyses ont conduit à suggérer que plus l'affinité du TCR décroît et plus l'expression d'Eomes augmente. De plus, l'augmentation de l'expression du facteur de transcription Bcl-6 par les LT de faible affinité indiquent que l'activation des LT de faible affinité induit un programme transcriptionnel qui favorise le développement des cellules mémoires. Aussi, seule l'activation des LT de forte affinité conduit à une augmentation sensible de l'expression du récepteur à l'IL-12, indiquant que l'affinité du ligand régule la capacité de réponse des LT à l'IL-12, et donc l'expression de Tbet et d'Eomes.

## Blimp-1 et Bcl-6

Les facteurs de transcription répresseurs Blimp-1 et Bcl-6 jouent également un rôle dans les propriétés fonctionnelles des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs et des LT CD8<sup>+</sup> mémoires. Blimp-1 favorise les fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs ainsi que leur différenciation en cellules mémoires LT<sub>EM</sub> (Kallies et al., 2006; Kallies, Xin, Belz, & Nutt, 2009; Martins et al., 2006). Inversement, son absence favorise la génération de LT CD8<sup>+</sup> centraux mémoires (LT<sub>CM</sub>) aux capacités prolifératives plus accrues et qui survivent plus longtemps (Rutishauser et al., 2009). Contrairement à Blimp-1, Bcl-6 régule négativement les fonctions cytolytiques des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs en inhibant l'expression de la granzyme B (Yoshida et al., 2006) et favorise la génération et le maintien des LT CD8<sup>+</sup> centraux mémoires (LT<sub>CM</sub>) (Figure 17) (Ichii et al., 2002; Ichii, Sakamoto, Kuroda, Tokuhisa, & Alerts, 2004).



**Figure 17 :** Rôles de Bcl-6 et Blimp1 dans la différenciation des LT CD8<sup>+</sup>

Modified from Shane Crotty et al, *Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation* Nature Immunology 2010

Les rôles respectifs des facteurs de transcription Blimp-1 et Bcl-6 ont principalement été investigués dans un contexte d'infection virale chez la souris. Blimp-1 est nécessaire à la différenciation terminale des LT CD8<sup>+</sup> SLECs (KLRG1<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>) et son expression favorise la production de molécules effectrices cytotoxiques. Inversement, son absence est associée au développement des MPECs (KLRG1<sup>low</sup> CD127<sup>high</sup>) capables de se différencier LT CD8<sup>+</sup> mémoires à longue durée de vie. Les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs mémoires (LT<sub>EM</sub>) expriment davantage Blimp-1 que les LT CD8<sup>+</sup> centraux mémoires (LT<sub>CM</sub>). Bcl-6 est un facteur de transcription clé impliqué dans la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> mémoires, sur-exprimé par les LT CD8<sup>+</sup> mémoires et jouant un rôle majeur dans la prolifération cellulaire.



## C. Epuisement lymphocytaire et immunothérapies

### 1. Les récepteurs inhibiteurs des LT CD8<sup>+</sup>

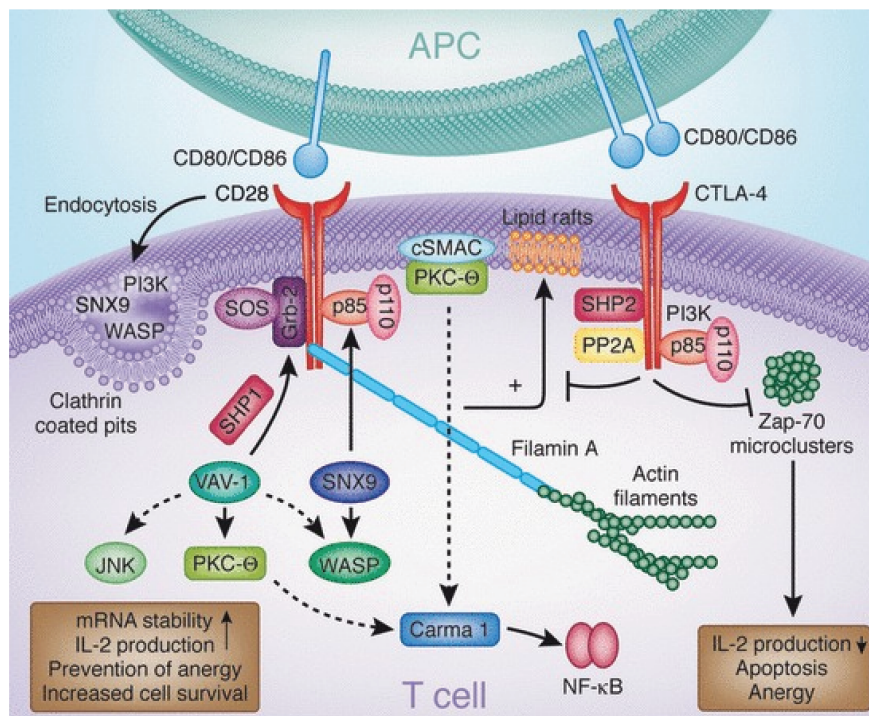
L'activation et les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont finement régulées par la présence de récepteurs inhibiteurs qui transduisent des signaux « négatifs » nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire et à l'inhibition du développement de réponses autoimmunes. Bien que les récepteurs inhibiteurs soient des marqueurs d'activation des LT CD8<sup>+</sup>, ils diminuent sensiblement leurs fonctions effectrices et jouent un rôle majeur dans l'échappement des cellules tumorales à leurs capacités lytiques.

#### a) *CTLA-4*

##### (1) Structure, expression et voie de signalisation

CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, CD152) est un récepteur transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) exprimé de façon transitoire à la surface des lymphocytes T activés par le TCR. Malgré sa structure extracellulaire relativement identique à celle de CD28, CTLA-4 forme des homodimères pour interagir de façon bivalente avec une affinité de liaison beaucoup plus élevée avec CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) exprimés par les CPA (Peach et al., 1994; Stamper et al., 2001). En effet, la constante de dissociation du complexe CTLA-4 /CD80 possède une constante de dissociation de 12nm tandis que celle du complexe CD28/CD80 est de 200nm environ (Rudd et al., 2009). Suite à son interaction avec ses ligands, CTLA-4 initialement localisé au niveau du centrosome se réoriente au niveau de la synapse immunologique (SI) pour déstabiliser le recrutement des récepteurs coactivateurs CD28 et ICOS (Egen & Allison, 2002; Parry, Chemnitz, Frauwirth, Lanfranco, & Riley, 2005; Pentcheva-Hoang, Egen, Wojnoonski, & Allison, 2004; Riley et al., 2001). De façon intéressante, il a été indiqué que l'intensité et la quantité du signal du TCR sont proportionnelles à la translocation de CTLA-4 à la membrane des lymphocytes T et donc à l'inhibition de la transduction des signaux coactivateurs (Egen & Allison, 2002).

L'engagement de CTLA-4 induit la phosphorylation du domaine cytoplasmique YVKM au niveau des tyrosines Y201 et Y218 par les kinases de la famille Lck et Fyn, respectivement. Les tyrosines phosphorylées permettent d'une part de favoriser l'interaction de CTLA-4 avec le TCR au niveau des chaînes CD3 $\zeta$  (Chikuma, Imboden, & Bluestone, 2003; K. Lee et al., 1998) et d'autre part de lier la phosphatase SHP-2 (Src-homogy-containing tyrosine phosphatase-2) (Chuang et al., 1999; Marengere, Luc E Waterhouse, Duncan, Mittrucker, Feng, & Mak, 1996). La phosphatase SHP-2 déphosphoryle les tyrosines des chaînes CD3 $\zeta$  (K. Lee et al., 1998) et le régulateur p52SCH de RAS (Marengere, Luc E Waterhouse et al., 1996) afin d'inactiver Akt et inhiber les signaux activateurs résultant de la costimulation TCR/CD28 (Parry, Chemnitz, Frauwirth, Lanfranco, & Riley, 2005) (Figure 18). Les fonctions d'Akt sont également inhibées par la phosphatase PP2A qui interagit au niveau du motif intracytoplasmique YVKM de CTLA-4 (Chuang et al., 2000; Parry, Chemnitz, Frauwirth, Lanfranco, & Riley, 2005). Ainsi, CTLA-4 régule proportionnellement les signaux activateurs de CD28 en inhibant l'activité des facteurs de transcription AP-1, NFAT et NF $\kappa$ B impliqués dans l'acquisition des fonctions prolifératives et effectrices des lymphocytes T (Fraser, Rinc, Mccoy, & Gros, 1999).

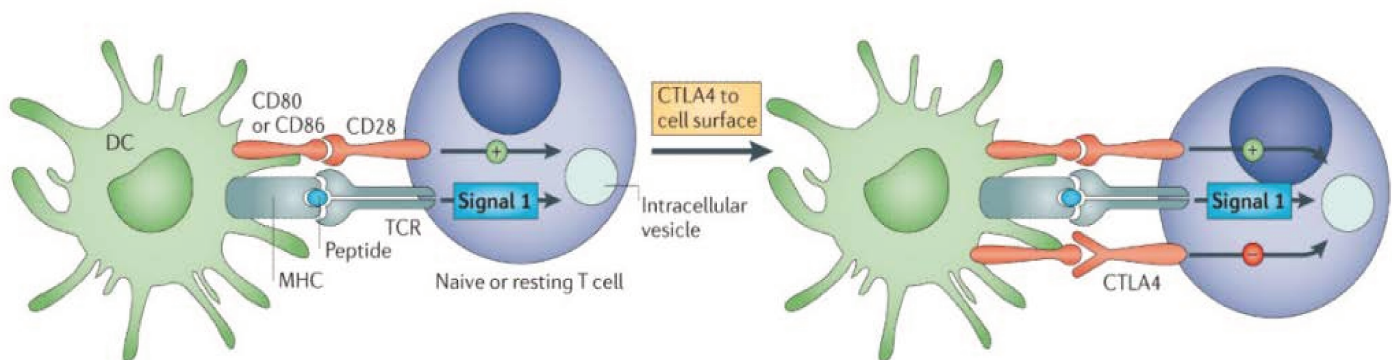


**Figure 18 :** CTLA-4 inhibe les fonctions de CD28

From C. Rudd et al, *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction Immunological Reviews*, 2009

## (2) Fonctions de CTLA-4

La stimulation de CTLA-4 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> inhibent donc la transcription des gènes codant pour l'IL-2 et l'IL-2R $\alpha$  nécessaires à leur prolifération et à leur sécrétion de cytokines effectrices (Brunner et al., 1999; Karandikar, 1996; B. M. E. Krummel & Allison, 1996; Walunas, Christina, & Bluestone, 1996). Des études menées *in vivo* sur des souris CTLA-4<sup>-/-</sup> et *in vitro* sur des cellules humaines (cellules circulantes de donneur sains ou lignées cellulaires JURKAT) ont permis par la suite de caractériser les mécanismes moléculaires à l'origine de la régulation des fonctions lymphocytaires par CTLA-4. Elles ont démontré que CTLA-4 augmente le seuil d'activation des LT CD8<sup>+</sup> en augmentant leur motilité, associée à une diminution de la durée et de l'intensité de leurs interactions avec les CPA. Ainsi, l'engagement de CTLA-4 réduit la formation des microclusters des molécules clés de la voie du TCR telles que ZAP-70 et LAT afin de diminuer la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 par les LT CD8<sup>+</sup> activés (Chikuma et al., 2003; Gajewski, Fallarino, & Fields, 2001; Martin, Schneider, Azouz, & Rudd, 2001; Schneider et al., 2006; Schneider, Smith, Liu, Bismuth, & Rudd, 2008). La régulation des fonctions effectrices des lymphocytes T joue donc un rôle majeur dans le maintien de la tolérance immunitaire périphérique. Malgré la faible expression de CD80 et CD86 à la surface des cellules dendritiques immatures, leurs interactions avec CTLA-4 limitent l'activation précoce des LT et inhibent le développement de maladies auto-immunes (Chambers, Kuhns, Jackson, & Allison, 2001) (Figure



**Figure 19 :** CTLA-4 inhibe l'activation précoce des lymphocytes T

From Drew M. Pardoll, *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy* Nat Rev Cancer, 2012

CTLA-4 est un récepteur inhibiteur qui régule négativement l'activation du lymphocyte T à la suite de son interaction avec les DC présentant l'antigène. Initialement séquestré dans des vésicules intracellulaires des lymphocytes T non activés, CTLA-4 est transporté à la surface membranaire ; son taux d'expression est proportionnel à l'intensité de la stimulation du TCR (signal 1) et de CD28.

19).

En effet, il a été démontré sur des modèles murins de sclérose en plaque et de diabète que l'injection d'un anticorps antagoniste anti-CTLA-4 dans les phases précoces de la maladie induit une accumulation rapide de lymphocytes T dans le pancréas qui accélère le développement de la maladie et augmente son agressivité (Karandikar, 1996; Lühder, Höglund, Allison, Benoist, & Mathis, n.d.). Bien qu'il ait été démontré chez la souris que l'absence de CTLA-4 (CLTA-4<sup>-/-</sup>) n'altère pas le développement des thymocytes, elle favorise l'interaction entre CD28 et B7 pour induire une prolifération incontrôlée de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs qui infiltrent massivement les tissus et détruisent plusieurs organes (Chambers, Sullivan, & Allison, 1997; E A Tivol et al., 1997; Elizabeth A Tivol, Borriello, Schweitzer, Bluestone, & Sharpe, 1995; Waterhouse et al., 1995).

Les travaux visant à mieux comprendre le rôle de CTLA-4 dans les fonctions lymphocytaires ont été réalisés dans le cadre d'infections virales sur des souris chimériques RAG2<sup>-/-</sup> dont le pool lymphocytaire a été reconstitué avec l'injection de lymphocytes T CTLA-4<sup>-/-</sup> et CTLA-4<sup>+/+</sup> (Bachmann et al., 1999, 2001). Ces travaux ont indiqué que l'absence de CTLA-4 n'altère pas le ratio LT CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> et ne modifie ni leur prolifération ni leurs fonctions effectrices en réponse à diverses infections (infections virales aiguë, chronique et permanente). Cependant, l'absence de CTLA-4 induit une diminution du nombre de lymphocytes présents dans la rate et dans les ganglions drainants, ce qui tend à suggérer que la régulation de la survie des LT par CTLA-4 ne résulte pas de propriétés intrinsèques mais plutôt de la sécrétion de facteurs solubles immunosuppresseurs (Bachmann et al., 1999, 2001). Ces études ont par la suite permis de révéler que l'expression de CTLA-4 par les LTreg joue un rôle important dans leurs fonctions immunosuppressives (Peggs, Quezada, Chambers, Korman, & Allison, 2009; Rudd, 2008; Wing et al., 2008).

Malgré son rôle majeur dans le maintien de la tolérance périphérique, plusieurs modèles expérimentaux de cancers (carcinome, fibrosarcome, thymome et cancer de l'ovaire) ont démontré que le blocage de CTLA-4 augmente l'expansion clonale et les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> dans les phases précoces de la réponse immunitaire. L'augmentation de leur production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  est corrélée à une diminution de la taille tumorale et à une amélioration de la survie des souris malades (Leach, Krummel, & Allison, 1996; Shrikant, Khoruts, & Mescher, 1999; Yang et al., 1997).

### (3) Immunothérapies anti-CTLA-4

Suite à l'identification du rôle de CTLA-4 dans la diminution du seuil d'activation des LT CD8<sup>+</sup> dans les phases initiales de la tumorigénèse (Chambers, Sullivan, Truong, & Allison, 1998; Egen & Allison, 2002; M. F. Krummel & Allison, 1995), le blocage de CTLA-4 a été considéré comme une approche thérapeutique prometteuse pour potentialiser les fonctions antitumorales des LT CD8<sup>+</sup>. Cependant, l'administration d'un anti-CTLA-4 ne conduit pas à la régression de tumeurs faiblement immunogéniques mais ne fait que ralentir sa croissance. Au vu de l'utilisation limitée des vaccins thérapeutiques GVAX ou FVAX qui induisent une tolérance des LT CD8<sup>+</sup> vis-à-vis de l'antigène tumoral présenté chroniquement par les CPA, la co-injection d'un anti-CTLA-4 avec ces vaccins restaure les fonctions antitumorales des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> « anergisés » et augmente sensiblement le ratio LT CD8<sup>+</sup> effecteurs mémoires/ LT<sub>reg</sub> au site de la tumeur (Curran & Allison, 2009; Hurwitz, Yu, Leach, & Allison, 1998; B. Li et al., 2007; Sotomayor, Borrello, Tubb, Allison, & Levitsky, 1999). Ainsi, des modèles expérimentaux ont mis en évidence que la combinaison des deux traitements limite sensiblement la croissance du mélanome (B16/BL6), du carcinome mammaire (SM1) ou du carcinome prostatique (modèle TRAMP) et améliore la survie des souris malades chez environ 60% d'entre elles.

La combinaison du blocage de CTLA-4 et de la stimulation de CD137 s'est également avérée efficace dans un modèle murin du cancer du côlon (MC38) puisqu'il diminue les réactions auto-immunitaires induites par le seul traitement anti-CTLA-4 et accroît les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> (Kocak et al., 2006). La recherche permanente d'une meilleure réponse antitumorale a conduit les chercheurs à investiguer ultérieurement les effets de la combinaison du vaccin FVAX, de l'anti-CTLA-4 et de l'anti-CD137. La synergie des traitements est efficace puisqu'elle induit une augmentation du nombre et des propriétés effectrices des LT CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur de souris porteuses de mélanome (Curran et al., 2011). Les premiers essais cliniques réalisés chez des patients atteints de mélanome métastatique ont révélé que l'anti-CTLA-4 (MDX-010, Ipilimumab) augmente la prolifération et les fonctions effectrices des LT spécifiques de la tumeur, associées à la régression de la charge tumorale et à l'amélioration de la survie des patients (Hodi et al., 2010; Schadendorf et al., 2015; Yuan et al., 2008).

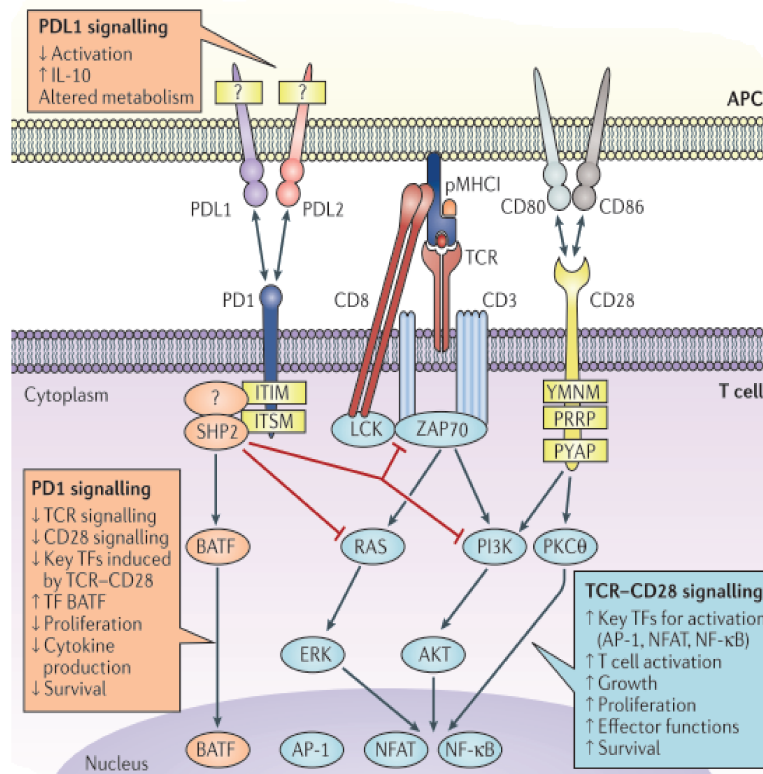
L'Ipilumab a été approuvé en 2011 par la FDA ( Food Drug administration) mais son utilisation est relativement restreinte au traitement du mélanome puisque qu'il conduit au développement de nombreux effets indésirables tels que des lymphoproliférations bénignes dans certains cancers, dont le lymphome B et le cancer de la prostate (Ansell et al., 2006; Beer et al., 2016).

## *b) PD-1*

### (1) Structure, expression et voie de signalisation

PD-1 (Programmed cell death-1, CD279, Pcdcd1) est un récepteur transmembranaire exprimé à la surface des lymphocytes T activés jouant un rôle critique dans la régulation de leurs fonctions et dans le maintien de la tolérance immunitaire périphérique (Nishimura, Nose, Hiai, Minato, & Honjo, 1999; Probst, Mccoy, Okazaki, Honjo, & Broek, 2005). L'interaction de PD-1 avec ses ligands PD-L1 (B7-H1 ; CD274) et PD-L2 (B7-DC ; CD273) majoritairement exprimés par les cellules dendritiques, les monocytes activés et les macrophages (Brown et al., 2003; Freeman, Gordon J.Collins et al., 2000) induit la phosphorylation de PD-1 au niveau de ses des motifs intracellulaires ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) et ITIM ( Immunoreceptor tyrosine- based inhibitory motif), respectivement. Suite à l'activation des lymphocytes T par le TCR, la kinase Lck constitutivement active et liée au domaine cytoplasmique des corécepteurs CD4 ou CD8 phosphoryle la tyrosine Y248 du motif ITIM de PD-1, constituant ainsi un site de reconnaissance par la phosphatase SHP-2.

L'engagement de PD-1 stabilise la synapse immunologique et réduit la motilité des lymphocytes T pour favoriser la transduction optimale des signaux inhibiteurs (Fife et al., 2009). Ainsi, la phosphatase SHP-2 déphosphoryle les motifs ITAMs de le chaîne  $\zeta$  du CD3 afin de diminuer la phosphorylation de ZAP-70 organisée en microclusters à la membrane plasmique (Zinselmeyer et al., 2013) et inactiver la voie de signalisation de la PI3k/Akt/mTOR nécessaire à l'acquisition des propriétés effectrices des lymphocytes T (*Figure 20*) (Chemnitz, Parry, Nichols, June, & Riley, 2004; Freeman, Gordon J.Collins et al., 2000; Parry, Chemnitz, Frauwirth, Lanfranco, Braunstein, et al., 2005). L'engagement de PD-1 induit principalement la déphosphorylation du TCR mais déphosphoryle également les tyrosines cytoplasmiques des récepteurs coactivateurs CD28 et CD226 (Hui et al., 2018; B. Wang et al., 2018). Le rôle de CD226 dans les fonctions des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> fera l'objet du prochain chapitre de ce manuscrit.



**Figure 20 :** Voie de signalisation de PD-1

From Arlene H. Sharpe and Kristen E. Pauken, *The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway* Nature Reviews Immunology, 2018

## (2) Fonctions de PD-1

L'interaction entre PD-1 et ses ligands augmente le seuil d'activation des LT activés en inhibant les signaux principalement issus de l'engagement de CD28 (Carter et al., 2002; Parry, Chemnitz, Frauwirth, Lanfranco, & Riley, 2005) (Figure 20) afin de diminuer leur prolifération et leur sécrétion d'IFN-  $\gamma$  (Carter et al., 2002; Freeman, Gordon J. Collins et al., 2000; Keir et al., 2006). Une étude intéressante a démontré que la concentration d'IL-2 produite par les LT CD4<sup>+</sup>, ainsi que l'IL-7 ou l'IL-15 qui induisent l'activation du facteur de transcription STAT5, peuvent reverser les effets régulateurs négatifs de PD-1 (F. Bennett et al., 2003). Ainsi, seule la costimulation de CD28 et non pas d'ICOS ( qui n'induit pas de production d'IL-2) est capable d'augmenter l'expression de l'IL-2R $\alpha$  qui permet de potentialiser la prolifération des lymphocytes T (F. Bennett et al., 2003).

### Rôle de PD-1 dans le maintien de la tolérance immunitaire

L'interaction entre PD-1 et PD-L1 est un mécanisme majeur dans le maintien de la tolérance immunitaire périphérique puisqu'il a été démontré *in vivo* que l'absence (souris PD-L1<sup>-/-</sup> ou PD-1<sup>-/-</sup>) ou le blocage de cette interaction conduit au développement de maladies autoimmunes caractérisées par une infiltration massive de lymphocytes T activés dans divers organes (système nerveux central, foie, cœur) (Dong et al., 2004; Nishimura et al., 1999; Nishimura, Okazaki, & Tanaka, 2001; Salama et al., 2003). En effet, l'interaction permanente entre PD-1 et ses ligands exprimés à la fois par les CPA et les cellules parenchymateuses inhibe l'activation précoce des LT au cours du priming dans les organes lymphoïdes secondaires et leurs fonctions effectrices dans les tissus périphériques, respectivement (Fife et al., 2009; Keir et al., 2006). Conformément à ces résultats, il a été indiqué récemment que l'expression de PD-1 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> répondeurs aux antigènes du soi est un mécanisme de tolérance immunitaire pouvant être réversé *in vivo* en bloquant l'interaction entre PD-1 et PD-L1 (Goldberg et al., 2017).

### Rôle pro-tumoral de PD-1

L'expression des ligands de PD-1 par de nombreux types cellulaires favorise la régulation négative des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> au cours des différentes phases de la réponse immunitaire antitumorale. Dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur, le microenvironnement immunosuppresseur (riche en IL-10 et en VEGF) favorise l'expression de PD-L1 et de PD-L2 à la surface des cellules dendritiques matures afin de diminuer leurs capacités à activer la prolifération et les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> (Brown et al., 2003; Curiel, Wei, Dong, Chen, & Zou, 2003). En effet, il a été démontré *in vitro* puis *in vivo* que le blocage de PD-L1 à la surface des cellules dendritiques augmente la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 par les LT CD8<sup>+</sup> activés et qu'il induit une forte régression de la tumeur chez des souris immunodéficientes *NOD-SCID* injectées avec des cellules tumorales ovariennes humaines (Curiel et al., 2003). Par ailleurs, des études ont indiqué que les cellules endothéliales expriment PD-L1 et PD-L2 en présence d'IFN- $\gamma$  afin de diminuer la production d'IFN- $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup> (Iwai, Terawaki, Ikegawa, Okazaki, & Honjo, 2003; Rodig et al., 2003).

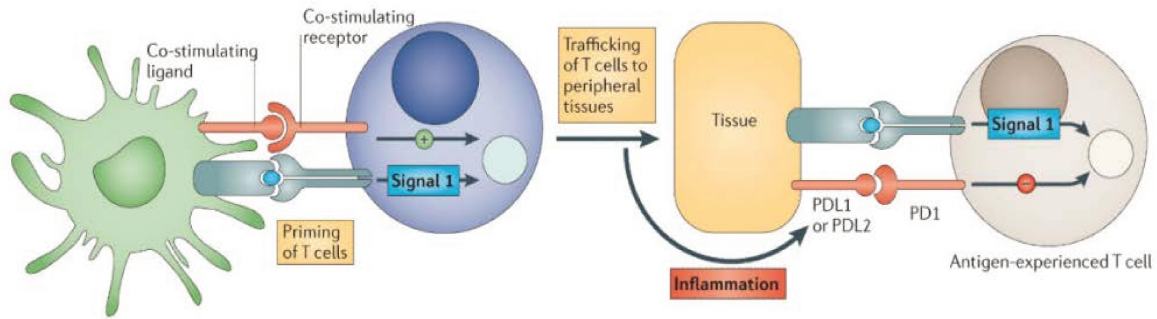


Comme l'indiquent les *Figure 21* et *Figure 22*, PD-L1 est également exprimé par de nombreux types de cancers afin de restreindre les capacités cytolytiques des LT CD8<sup>+</sup> et leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les phases tardives de la réponse immunitaire (Blank et al., 2004; Brown et al., 2003; Dong et al., 2002; Gevensleben et al., 2015).

Organ	PD-L1 or PD-L2
Lung, ovary, skin, colon	PD-L1
Glioma	PD-L1
Bladder, breast, colon etc. <sup>a</sup>	PD-L1
SCCHN	PD-L1
Lung	PD-L1
Renal cell	PD-L1
Esophagus	PD-L1, PD-L2
Stomach	PD-L1
Breast	PD-L1
Oral squamous cell	PD-L1
Urothelial cell	PD-L1
Ovary	PD-L1, PD-L2
Pancreas	PD-L1, PD-L2
Renal cell	PD-1

**Figure 21** : Expression des ligands de PD-1 par de nombreux tissus tumoraux, chez l'Homme

From Taku Okazaki and Tasuku Honjo, *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application* *International Immunology*, 2007



**Figure 22 :** PD-1 régule l'activation des lymphocytes T au site tumoral

From Drew M. Pardoll, *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy* Nat Rev Cancer, 2012

Contrairement à CTLA-4, PD-1 régule principalement les fonctions des LT effecteurs dans les tissus et les tumeurs. L'expression de PD-1 est induite à la suite de l'activation des LT par les cellules dendritiques et perdue lors de sa migration en périphérie. Les signaux inflammatoires présents dans les tissus induisent l'expression des ligands de PD-1 afin d'inhiber les fonctions effectrices des LT activés.

Il a par ailleurs été indiqué *in vitro* et *in vivo* sur un modèle de mélanome que l'interaction entre PD-L1 et PD-1 induit l'apoptose des LT CD8<sup>+</sup> pour favoriser la croissance tumorale (Dong et al., 2002). Des analyses fonctionnelles et immunohistochimiques réalisées sur des cellules de patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules ont par ailleurs confirmé que la surexpression de PD-L1 par les cellules tumorales est positivement corrélée à la diminution de LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs (Konishi, Yamazaki, Azuma, Kinoshita, & Dosaka-akita, 2004) et que l'expression de PD-1 à leur surface est associée à leurs faibles capacités effectrices et prolifératives (Y. Zhang, Huang, Gong, Qin, & Shen, 2010).

### (3) Immunothérapies anti-PD1

Suite à l'observation que le blocage de l'interaction PD-L1/PD-1 diminue la taille tumorale et augmente la survie des souris porteuses de tumeurs (mélanome, mastocytome, carcinome, leucémie myéloïde aigue) (Blank et al., 2004; Hirano et al., 2005; Juneja et al., 2017; Mumprecht et al., 2009; Strome et al., 2003), les effets anti-tumoraux de l'anti-PD-1 ont été caractérisés chez l'Homme. Ainsi, les études fonctionnelles réalisées *in vitro* sur des LT infiltrant les tumeurs de patients ont par la suite prouvé l'efficacité de l'anti-PD-1 à restaurer les fonctions antitumorales des LT CD8<sup>+</sup> (Mumprecht et al., 2009; Y. Zhang et al., 2010) et ont conduit au développement d'essais cliniques avec l'anticorps monoclonal anti-PD-1, le Nivolumab (MDX-1106). Les essais cliniques réalisés sur des patients atteints de mélanome métastatique, de cancer de la prostate, du cancer du poumon ou encore de carcinome rénal ont révélé que le Nivolumab augmente la fréquence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques au site tumoral et induit une réponse partielle ou totale chez certains individus (Brahmer et al., 2010; Genzler et al., 2016).

Les immunothérapies anti-PD-1 basées sur l'injection d'anticorps bloquants PD-1 (Pembrolizumab et Nivolumab) ont donc été approuvées par la FDA en 2014 au vu de leurs capacités à améliorer sensiblement la survie des patients. Elles sont actuellement utilisées en monothérapie dans le traitement du cancer de la vessie, du mélanome, du cancer colorectal, du cancer du poumon et du lymphome (Zou, Wolchok, & Chen, 2016) (*Figure 23*).

Cible	Molécule	Indication	Modalité d'administration
CTLA4	Ipilimumab	Mélanome	Intraveineux, 1 perfusion toutes les 3 semaines, 4 injections au total
PD1	Nivolumab	Mélanome Cancer du poumon Cancer du rein Lymphome de Hodgkin Cancer ORL Cancer de la vessie	Intraveineux, 1 perfusion toutes les 2 semaines
	Pembrolizumab	Mélanome Cancer du poumon Lymphome de Hodgkin Cancer de vessie	Intraveineux, 1 perfusion toutes les 3 semaines
PD-L1	Atezolizumab	Cancer de vessie Cancer du poumon	Intraveineux, 1 perfusion toutes les 3 semaines
	Durvalumab	Cancer du poumon	Intraveineux, 1 perfusion toutes les 2 semaines
	Avelumab	Carcinome de Merkel	Intraveineux, 1 perfusion toutes les 2 semaines

**Figure 23** : Les anticorps bloquants utilisés actuellement en monothérapie antitumorale

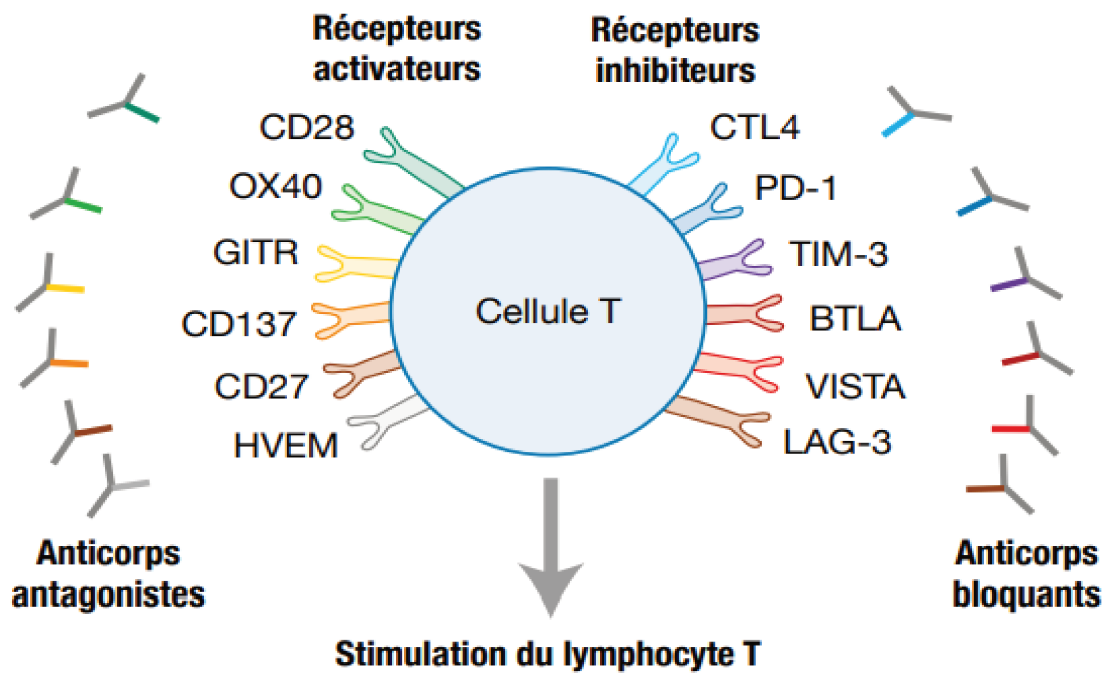
From Perrine Vuagnat et Stéphane Champiat, *Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux*, 2018

#### (4) Les bithérapies

##### Anti-CTLA-4/ Anti-PD-1

La faible immunogénicité de nombreuses tumeurs a conduit les chercheurs à combiner des stratégies vaccinales et immunothérapeutiques pour potentialiser les fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup>. Un modèle de mélanome a ainsi mis en évidence que l'administration du vaccin FVAX en combinaison avec les anticorps ciblant les récepteurs inhibiteurs CTLA-4 ou PD-1 augmente le nombre de LT CD8<sup>+</sup> effecteurs au site de la tumeur (Curran, Montalvo, Yagita, & Allison, 2010). Cependant, leurs effets thérapeutiques sont négligeables puisqu'ils n'augmentent la survie des souris que chez 10% et 25% d'entre elles, respectivement. Ainsi, il a été révélé que la combinaison du blocage de PD-1 et de CTLA-4 augmente la survie chez 60% des souris et que la synergie des traitements accroît sensiblement la proportion de LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux capables de sécréter de l'IFN-γ et du TNF-α par rapport aux lymphocytes immunosuppresseurs LTreg (Curran et al., 2010).

L'efficacité de la combinaison anti-PD1/CTLA-4 a également été mise en évidence dans des modèles de cancer du côlon et du cancer de l'ovaire où il a été démontré que l'inhibition simultanée de PD-1 et CLTA-4 potentialise l'effet antitumoral des monothérapies en augmentant davantage les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup>, associées à une régression de la tumeur chez 75% des souris (Duraiswamy, Kaluza, Freeman, & Coukos, 2013). L'analyse des profils transcriptomiques des LT infiltrant les tumeurs de souris atteinte de tumeur immunogénique (modèle de sarcome MCA) traitées avec les anticorps bloquants a ensuite été réalisée. Elle a révélé que le blocage de PD-1 modifie principalement le métabolisme des cellules et augmente la voie de signalisation de l'IL-2 tandis que le blocage de CTLA-4 favorise l'expression des gènes du cycle cellulaire et des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> (notamment la sécrétion d'IFN- $\gamma$ ) (Gubin et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés sur des cellules issues de patients traités en monothérapie ou en bithérapie avec l'Ipililumab et le Nivolumab. L'analyse des profils transcriptomiques des LT intratumoraux indique que le seul blocage de CTLA-4 ou de PD-1 conduit à activer davantage la prolifération ou les fonctions cytolytiques, respectivement. La combinaison des traitements favorise une prolifération clonale associée à une différenciation en lymphocytes mémoires dont la production de granzyme B est augmentée (Das et al., 2015). Ainsi, des études cliniques réalisées sur des cohortes de patients atteints de mélanome (Wolchok et al., 2013) et de carcinome rénal (Motzer et al., 2018) ont révélé que la combinaison de Nivolumab et l'Ipililumab améliore sensiblement les réponses cliniques. Cependant, leurs administrations chez des patients atteints de mélanome restent peu utilisées puisqu'elles engendrent de nombreux effets toxiques associées à de graves complications (pneumopathies, troubles thyroïdiens, hépatite) (Wolchok et al., 2013). Malgré les résultats très prometteurs des immunothérapies actuelles, certains cancers y sont toujours réfractaires et conduisent les chercheurs à développer de nouvelles combinaisons thérapeutiques qui consistent à bloquer les récepteurs inhibiteurs et à activer les récepteurs activateurs des LT CD8<sup>+</sup> (Figure 24).



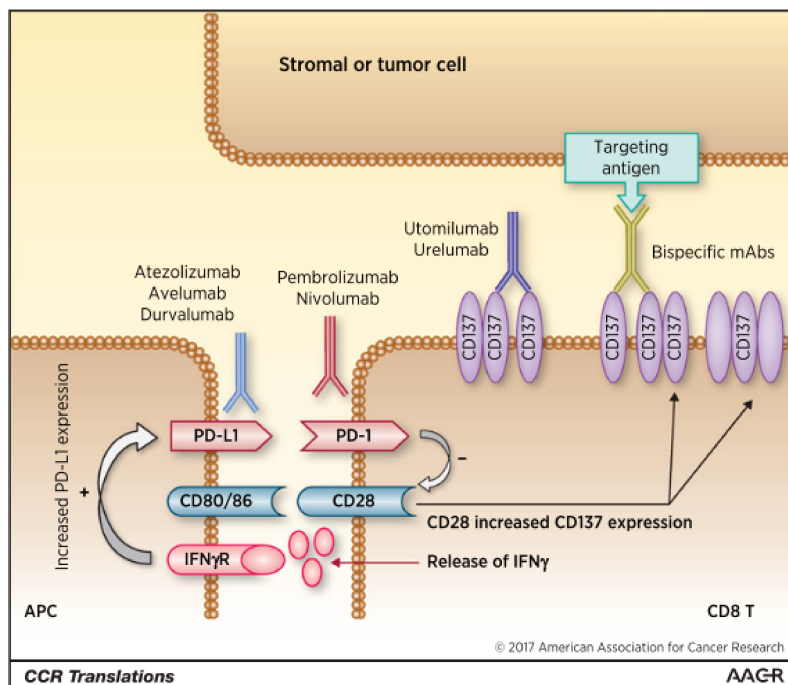
**Figure 24** : Les immunothérapies futures consistent à inhiber les récepteurs inhibiteurs et à activer les récepteurs activateurs pour potentialiser plus efficacement la réponse antitumorale T

From Perrine Vuagnat et Stéphane Champiat, *Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux*, 2018

### Anti-PD-1/ Anti-CD137

La faible immunogénicité de nombreux cancers humains (notamment le mélanome) est associée à l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales et à un état de « tolérance immunitaire » des LT CD8<sup>+</sup> qui pourrait justifier les faibles réponses cliniques des patients traités en monothérapie (Hirano et al., 2005). Il a ainsi été démontré chez des souris injectées avec des cellules de mastocytomes exprimant PD-L1 (P815) puis traitées avec un anti-CD137 que la combinaison des thérapies anti-PD-1 et anti-CD137 augmente les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> au site tumoral et favorise une différenciation des LT CD8<sup>+</sup> spléniques en cellules mémoires.

Des résultats similaires ont été obtenus sur le modèle de mélanome B16F10, qui ont par ailleurs indiqué que la stimulation de CD137, en augmentant sa propre expression et celle de PD-1 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> spléniques et intratumoraux, favorise l'effet antitumoral de l'anti-PD-1 (S. Chen et al., 2015). Suite aux révélations que le traitement des patients avec l'Urelumab conduit à de graves dommages hépatiques, la société pharmaceutique Pfizer a commercialisé récemment un nouvel anticorps antagoniste anti-CD137, l'Utomilumab, aux propriétés antitumorales très efficaces et non toxiques chez des patients atteints de lymphome non hodgkinien (Gopal et al., 2015). La combinaison des anti-PD-1/PD-L1 et anti-CD137 (Utomilumab) est actuellement testée dans des essais cliniques dans le traitement de plusieurs cancers (Rodriguez-ruiz & Melero, 2017) (Figure 25).



**Figure 25 :** Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la synergie des immunothérapies anti-CD137 et anti-PD-1

From M. Rodriguez-ruiz and I. Melero, *Anti-CD137 and PD-1 / PD-L1 Antibodies En Route toward Clinical Synergy* Clinical Cancer Research 2017

Ce schéma permet de concevoir les éventuelles conséquences du blocage de PD-1 via un anti-PD-1 ( Nivolumab ou Pembrolizumab) et de la stimulation du CD137 via un anti-CD137 (l'Urelumab ou l'Utomilumab). Au vu des études préalables qui ont démontré que l'expression du CD137 est favorisée par la stimulation de CD28 et par le blocage de PD-1, il est suggéré que stimuler davantage le récepteur CD137 augmente la production d'IFN-γ. La production d'IFN-γ augmente l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales et favoriserait ainsi le blocage de la voie PD-1/PD-L1.

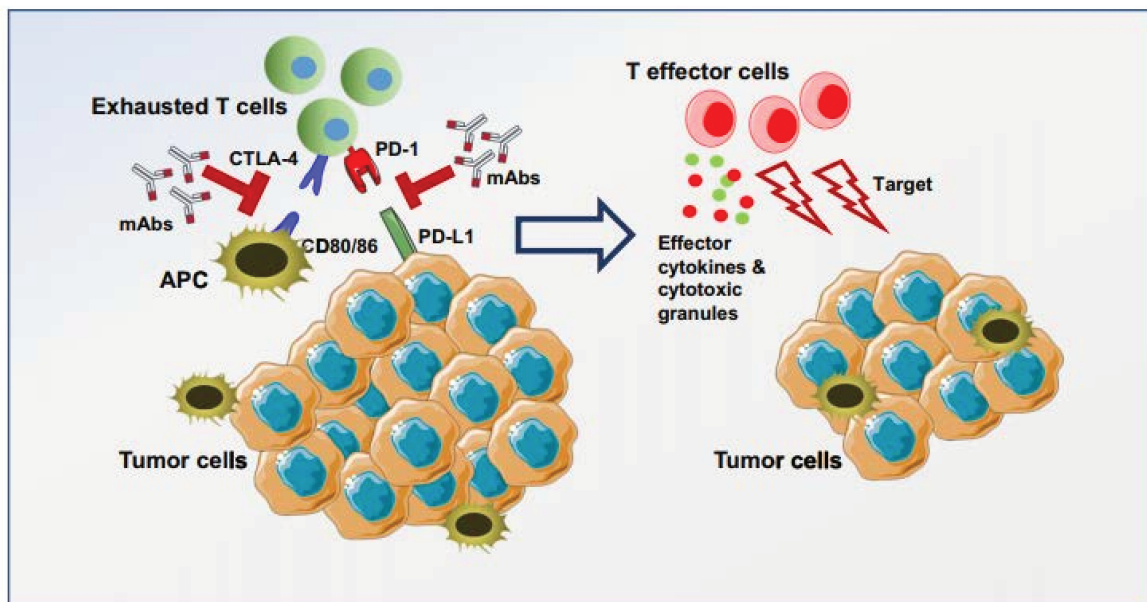
## 2. L'épuisement lymphocytaire

### a) *Phénotype et fonctions des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> épuisés*

Le microenvironnement tumoral, caractérisé par la présence de facteurs immunosuppresseurs et de cellules tumorales présentant chroniquement l'antigène aux LT CD8<sup>+</sup>, induit un état d'hyporéponse des LT CD8<sup>+</sup> qui éliminent moins efficacement les cellules cancéreuses. L'épuisement lymphocytaire est un phénomène initialement décrit dans un modèle murin d'infection virale chronique (souche CL13 du LCMV) qui définit la perte progressive des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> continuellement stimulés par un antigène (Zajac et al., 1998). En effet, les LT CD8<sup>+</sup> épuisés prolifèrent peu et ne sécrètent pas d'IL-2 et de TNF- $\alpha$  dans les phases précoces de l'infection puis perdent progressivement leurs capacités à sécréter de l'IFN- $\gamma$  et à lyser leurs cellules cibles au cours de leur différenciation. De nombreux modèles murins ainsi que des analyses *in vitro* de LT CD8<sup>+</sup> humains ont permis d'identifier de nombreuses similitudes phénotypiques et fonctionnelles entre les LT CD8<sup>+</sup> épuisés dans les infections virales chroniques et ceux infiltrant les tumeurs. Contrairement aux LT CD8<sup>+</sup> circulants spécifiques de la tumeur qui sécrètent de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation antigénique (Matsuzaki et al., 2010; Zippelius et al., 2004), les LT CD8<sup>+</sup> présents au site tumoral sécrètent peu de molécules effectrices (IFN- $\gamma$ , perforine et granzyme B) en réponse aux antigènes tumoraux Melan-A et NY-ESO-1 chez des patients atteints de mélanome et de cancer de l'ovaire, respectivement (Ahmadzadeh et al., 2009). Ces LT CD8<sup>+</sup> sont cependant capables de sécréter de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation par la PMA/ionomycine, suggérant donc que le microenvironnement tumoral est à l'origine d'une perturbation d'événements précoces dans la voie de signalisation du TCR (Zippelius et al., 2004). Dans la vaste majorité des cancers solides, les LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux sont des effecteurs mémoires CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD127<sup>low</sup> qui présentent de nombreuses similitudes phénotypiques, transcriptionnelles et fonctionnelles aux LT CD8<sup>+</sup> épuisés dans les infections virales chroniques (Blackburn et al., 2009; E. J. Wherry et al., 2007; J. E. Wherry & Ahmed, 2003). En effet, la coexpression des récepteurs inhibiteurs PD-1, Tim-3, CTLA-4 et BTLA-4 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur chez des patients atteints de mélanome suggère que ce sont des cellules en différenciation terminale, également caractérisées plus récemment dans un modèle murin de la maladie (Ahmadzadeh et al., 2009; Baitsch et al., 2011; Chihara et al., 2018; Fourcade et al., 2012).



En effet, chez la souris, la coexpression des récepteurs inhibiteurs PD-1, LAG-3, Tim-3 et TIGIT identifie en effet un cluster de LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs (Chihara et al., 2018). Chez l'homme, les LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs ovariennes expriment PD-1, CTLA-4 et LAG-3 (Matsuzaki et al., 2010) et les LT CD8<sup>+</sup> issus de tumeurs du poumon expriment progressivement PD-1, Tim-3, LAG-3, CTLA-4 puis BTLA4 (D. S. Thommen et al., 2015). De façon similaire aux LT CD8<sup>+</sup> épuisés chez des souris infectées avec la souche virale CL13 du LCMV (Blackburn et al., 2009; E. J. Wherry et al., 2007; J. E. Wherry & Ahmed, 2003; Zajac et al., 1998), l'hypofonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> épuisés au site tumoral est proportionnelle au nombre des récepteurs inhibiteurs engagés à leur surface (Baitsch et al., 2011; Fourcade et al., 2012; Matsuzaki et al., 2010; D. S. Thommen et al., 2015). En effet, il a été démontré dans le modèle murin LCMV que le blocage simultané de PD-1/LAG-3 (Blackburn et al., 2009) ou de PD-1/Tim-3 potentialise la prolifération et les capacités antivirales des LT CD8<sup>+</sup> (Jin et al., 2010). Ainsi, des modèles murins de carcinome du côlon (CT26) et de carcinome mammaire (4T1) ont révélé que les LT CD8<sup>+</sup> qui coexpriment les récepteurs inhibiteurs PD-1/Tim-3 ou PD-1/CTLA-4 sont les plus dysfonctionnels. La combinaison du blocage des récepteurs inhibiteurs restaure leurs fonctions antitumorales et conduit à l'élimination de la tumeur chez 50% et 75% des souris traitées,



**Figure 26** : Le blocage de PD-1 et CTLA-4 restaure les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> épuisés

From Darvin et al, *Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers* *Experimental & Molecular Medicine* 2018

respectivement (Sakuishi et al., 2010) (Figure 26).



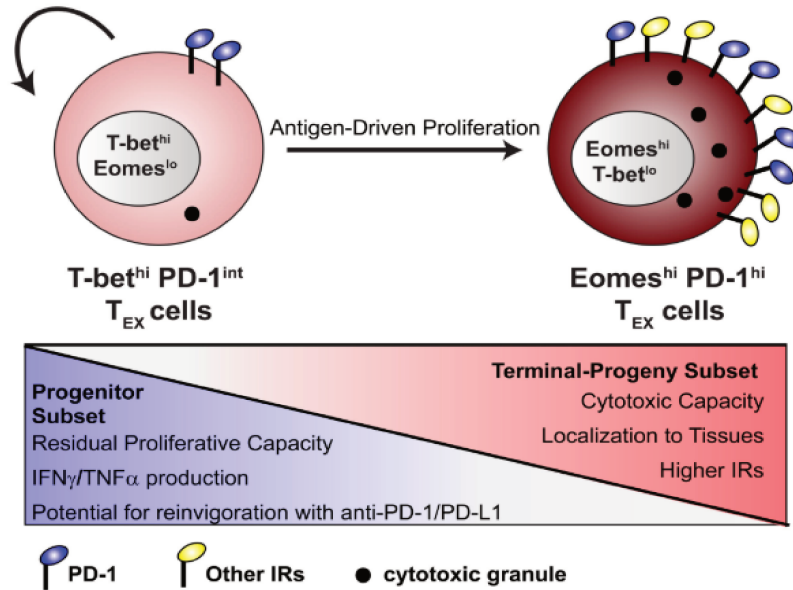
Dans des modèles expérimentaux de cancer colorectal et de fibrosarcome, la combinaison du blocage de PD-1 et LAG-3 augmente davantage la fréquence des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs par rapport au blocage d'un seul récepteur. Ainsi, le blocage PD-1/LAG-3 induit une diminution de la croissance tumorale et améliore la survie des souris malades (Woo et al., 2013). Un modèle de lymphome a également révélé que le blocage des récepteurs inhibiteurs PD-1 et B7RS1 (Prasad, Richards, Mai, & Dong, 2003) réduit la taille de la tumeur en favorisant l'expression de gènes effecteurs et en diminuant celle des gènes impliqués dans l'épuisement lymphocytaire (J. Li et al., 2018).

Chez l'Homme, les stimulations des LT CD8<sup>+</sup> épuisés *in vitro* en présence d'anticorps monoclonaux antagonistes (mAb) ont révélé que la synergie de la combinaison des blocages de PD-1, BTLA-4 et Tim-3 et de PD-1/LAG-3 conduit à une augmentation de la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques aux capacités prolifératives et effectrices accrues dans le cadre du mélanome (Fourcade et al., 2012) et du cancer de l'ovaire (Matsuzaki et al., 2010). Cependant, seule l'expression graduelle de PD-1 et de Tim-3 semble être corrélée au stade de la maladie chez des patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules (D. S. Thommen et al., 2015). De façon similaire, il a été indiqué que la coexpression de PD-1/Tim-3 à la surface de LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs de patients atteints de carcinome à cellules rénales est corrélée à la taille de la tumeur et constitue un biomarqueur de risque de rechute et de faible survie globale des patients (Granier et al., 2017). Ainsi, les LT CD8<sup>+</sup> épuisés expriment tous PD-1, dont la coexpression avec les autres récepteurs inhibiteurs dépend du type de cancer.

#### *b) Réponse aux immunothérapies anti-PD1*

Il a été initialement révélé chez l'Homme (individus atteints d'hépatite C) et chez la souris (modèle d'infection virale chronique LCMV) que le niveau d'expression de PD-1 conditionne la réponse des LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> aux immunothérapies anti-PD-1 (Blackburn, Shin, Freeman, & Wherry, 2008; Nakamoto & Chang, 2008). Seuls les LT CD8<sup>+</sup> exprimant des niveaux intermédiaires de PD-1 (PD-1<sup>int</sup>) prolifèrent en réponse à une stimulation antigénique et sécrètent davantage de cytokines effectrices en réponse aux anti-PD-L1 et anti-PD-1.

Il a par ailleurs été suggéré que les LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>int</sup> Tbet<sup>high</sup> Eomes<sup>low</sup> sont des cellules précurseurs qui se différencient en LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> Tbet<sup>low</sup> Eomes<sup>high</sup> high terminaux dont l'hyporéponse semble être corrélée à la coexpression de nombreux récepteurs inhibiteurs et à l'expression des facteurs de transcription Blimp-1 (Shin et al., 2009) et Eomes (Paley et al., 2012)



**Figure 27** : Les lymphocytes T épuisés peuvent être fonctionnellement identifiés sur les niveaux d'expression de PD-1 et sur l'expression des facteurs de transcription Eomes et Tbet

From K.E Pauken and E John Wherry *Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer Trends in Immunology 2015*

L'analyse des LT CD8<sup>+</sup> épuisés au cours de l'infection virale chronique LCMV chez la souris a conduit à l'identification de populations hétérogènes dont le phénotype conditionne leurs fonctions et leur réponse à l'immunothérapie anti-PD-1. Les LT PD-1<sup>int</sup> Tbet<sup>high</sup> Eomes<sup>low</sup> sont davantage capable de proliférer de produire du TNF-α et de l'IFN-γ que les LT PD-1<sup>high</sup> Tbet<sup>low</sup> Eomes<sup>high</sup> exprimant de nombreux récepteurs inhibiteurs (IR, Inhibitory receptors). Chez la souris, des expériences de transfert adoptif des deux populations ont révélé que les LT PD-1<sup>int</sup> Tbet<sup>high</sup> Eomes<sup>low</sup> se différencient en LT PD-1<sup>high</sup> Tbet<sup>low</sup> Eomes<sup>high</sup> de façon dépendante de l'antigène et que le blocage de la voie PD-1/PD-L1 cible principalement les LT PD-1<sup>int</sup>. Des observations similaires ont été également faites chez l'Homme, chez des patients atteints de HCV et d'HIV.

(Figure 27).

Les similitudes phénotypiques et fonctionnelles des LT CD8<sup>+</sup> épuisés dans les infections virales chroniques et les cancers ont conduit les chercheurs à évaluer si le niveau d'expression de PD-1 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux conditionne leurs réponses aux immunothérapies anti-PD1. Chez des patients atteints de cancer de la tête et du cou (Kansy et al., 2017) et des patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules (D. S. Thommen et al., 2015), l'infiltration des tumeurs par des LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> aux fonctions sécrétrices sensiblement réduites suggère

que les patients possédant majoritairement des LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> répondent peu aux immunothérapies anti-PD-1 (Nivolumab).

Chez les patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules, il a été suggéré que l'expression exclusive de Tim-3 et LAG-3 par les LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> ainsi que leur faible expression de CD28 est associée à leur défauts fonctionnels ainsi qu'à leur incapacité à répondre aux anti-PD-1 *in vitro* (D. S. Thommen et al., 2015; Daniela S. Thommen et al., 2018). En effet, une étude récente réalisée sur une cohorte de patients atteints de carcinome à cellules rénales a indiqué que la coexpression de PD-1 et Tim-3 par les LT CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur est associée à une faible survie des patients traités avec le Nivolumab (anti-PD-1) (Pignon et al., 2019).

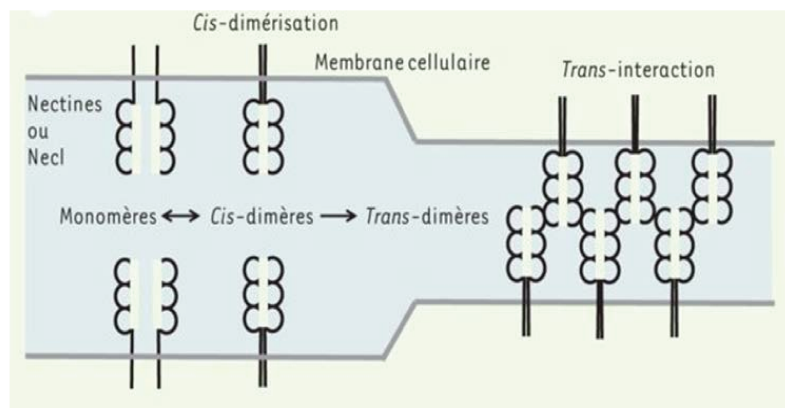
L'analyse des profils transcriptomiques des LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> et des LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>low/int</sup> infiltrant les tumeurs de patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules a indiqué que LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> ont un programme génétique associé à la prolifération cellulaire et au recrutement de cellules immunitaires au site tumoral (Daniela S. Thommen et al., 2018). Malgré leurs profondes altérations fonctionnelles associées à l'épuisement lymphocytaire (augmentation du métabolisme et réponse accrue à l'IL-10), les LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> stimulés par le TCR en présence d'IL-2 diminuent l'expression de PD-1 à leur surface et sécrètent davantage de cytokines effectrices. Des études rétrospectives réalisées sur des patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules ont ainsi indiqué que ces LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> présents au site tumoral sont répondeurs au Nivolumab (anti-PD1) et qu'ils permettent de prédire la réponse clinique des patients (Kamphorst et al., 2017; Daniela S. Thommen et al., 2018). L'analyse des LT CD8<sup>+</sup> du sang et ceux infiltrant la tumeur de patients atteints de mélanome traités avec le Pembrolizumab (anti-PD-1) a également révélé que les LT CD8<sup>+</sup> les plus répondeurs sont des LT CD45RA<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup> PD-1<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> « épuisés » qui expriment fortement le facteur de transcription Eomes (A. C. Huang et al., 2017; Paley et al., 2012). Par ailleurs, un modèle murin du cancer du cou et de la tête a également mis en évidence *in vivo* que l'anti-PD-1 réduit la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> et augmente celle des LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>low</sup>, associée à une diminution du volume tumoral (Kansy et al., 2017). Ainsi, il est actuellement suggéré que les immunothérapies anti-PD-1 agissent sur les LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> « les plus épuisés » afin de diminuer progressivement l'expression de PD-1 à la surface et les différencier en LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>int/low</sup> aux fonctions antitumorales efficaces. La proportion de LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> infiltrant les

tumeurs, initialement décrite comme un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du sein et du cancer du cou et de la tête (Kansy et al., 2017; Muenst et al., 2013), semble être positivement corrélée à la réponse clinique des patients traités avec l'anti-PD-1.

## D. Les récepteurs aux nectines et aux « nectine-like »

### 1. Les nectines et les « nectine-like »

Les nectines (Nec) et nectines-*like* (Necl) sont des protéines ubiquitaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines qui comprennent respectivement 4 (Nec 1-4) et 5 membres (Necl 1-5). Les nectines et nectines-*like* sont des protéines transmembranaires de type I qui présentent un domaine extracellulaire contenant trois domaines Ig-like (un domaine variable V et deux domaines constants C), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui interagit avec des protéines intervenant dans la réorganisation du squelette d'actine. Ainsi, les nectines ont été principalement décrites pour leurs rôles dans la formation de jonctions intercellulaires ainsi que dans le maintien de la polarité cellulaire (Takai, Miyoshi, Ikeda, & Ogita, 2008). Bien que les nectines-*like* soient également impliquées dans la formation des contacts intercellulaires, leurs rôles biologiques sont plus variés. Elles sont notamment impliquées dans la différenciation et la morphogénèse des cellules, et augmentent leur migration et leur prolifération (Ikeda et al., 2004; Kakunaga et al., 2004; Takai et al., 2008). Les domaines constants extracellulaires des nectines et des nectines-*like* leur permettent de former des *cis*-dimères par des interactions homophiliques à la surface d'une même cellule. Les *cis*-dimères forment des *trans*-dimères via les interactions hétérophiliques ou homophiliques des domaines Ig-like variables des nectine ou des nectine-*like*, ou ceux des ligands exprimés par une cellule adjacente (*Figure 28*).



**Figure 28 :** Les différents types d'interactions entre les nectines, les nectines-like et leurs ligands



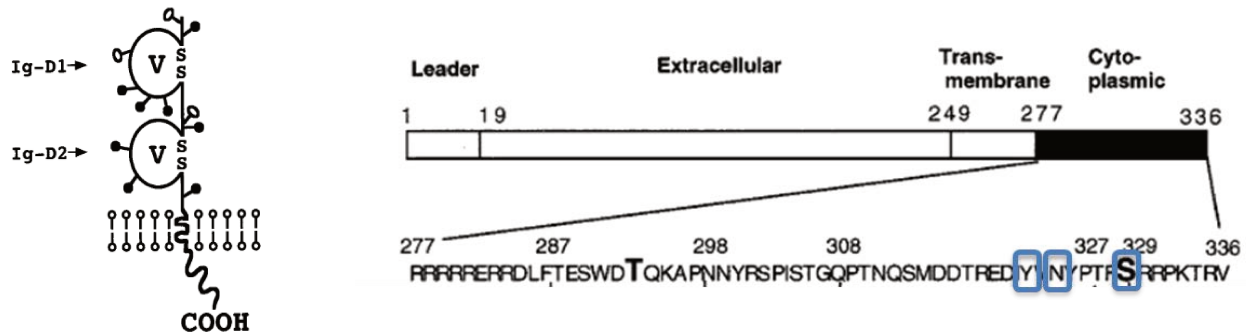
Bien que la nectine-like (Necl-5) (*poliovirus receptor PVR*, CD155) et la nectine-2  $\delta/\alpha$  (CD112) contribuent de façon importante aux propriétés structurales et fonctionnelles des cellules épithéliales et endothéliales, elles sont également surexprimées par les cellules dendritiques matures (Kamran et al., 2013; Pende et al., 2006) et de nombreuses cellules tumorales. Le stress génotoxique qui caractérise les cellules cancéreuses altère l'ADN et conduit à l'activation des protéines kinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (ATM- and Rad3-related) impliquées dans l'expression de CD112 et CD155 à leur surface (Iguchi-Manaka et al., 2008). Ainsi, CD112 et CD155 favorisent la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (Masson et al., 2001; Sakisaka & Takai, 2004) mais régulent également les fonctions des cellules immunitaires en interagissant avec les récepteurs DNAM-1 (CD226, TliSA-1, PTA1), CD96 (TACTILE) et TIGIT (WUCAM, VSTM3) exprimés principalement par les cellules NK (Natural Killer) et les lymphocytes T. Ainsi, CD112 et CD155 semblent jouer un rôle immunorégulateur de la réponse immunitaire antitumorale et peuvent potentiellement représenter des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement contre le cancer.

## 2. Signalisation du récepteur CD226

CD226 (DNAX accessory molecule 1, DNAM-1) est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des immunoglobulines exprimée par la majorité des lymphocytes T du sang circulant tels que les lymphocytes  $T\alpha\beta$ , les lymphocytes  $T\gamma\delta$ , les cellules NK cytotoxiques (Natural Killer), les monocytes et une sous-population de lymphocytes B (A. Shibuya et al., 1996). Le domaine extracellulaire de CD226 est constitué d'une séquence « leader » d'adressage à la membrane plasmique et d'une portion de 230 acides aminés comprenant deux domaines « Ig-like » (Ig-D1 et Ig-D2) caractérisés par des cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfure intra-chaînes. Le premier domaine extracellulaire Ig-D1 est impliqué dans l'interaction de CD226 avec ses ligands CD112 et CD155, bien que CD226 ait une plus forte affinité de liaison pour CD155 (Hou et al., 2014). En effet, les constantes de dissociation des complexes CD226/CD112 et CD226/CD155 indiquent que CD226 interagit davantage avec CD155 que CD112 ( $K_D$  CD226/CD155 =  $2,3 \times 10^{-7}$  et  $K_D$  CD226/CD112 =  $3,1 \times 10^{-7}$ ). Il a été suggéré que l'agrégation homophile de CD112 à la surface des cellules cibles favorise l'interaction de CD226 avec CD155 (Tahara-Hanaoka et al., 2004).



Le domaine transmembranaire de CD226 est composé de 28 acides aminés et la région intracytoplasmique de 60 acides aminés contient des sites putatifs de phosphorylation, notamment la tyrosine 322 et la sérine 329, à l'origine de l'initiation de cascades de



**Figure 29 :** Structure de CD226 et séquences d'acides aminés du domaine intracytoplasmique

From Sherrington, Paul D et al, TLISA1 (PTA1) activation antigen implicated in T cell differentiation and platelet activation is a member of the immunoglobulin superfamily exhibiting distinctive regulation of expression *The Journal of Biological Chemistry* 1997

And, modified from Shibuya et al, Protein Kinase C Is Involved in the Regulation of Both Signaling and Adhesion Mediated by DNAX Accessory Molecule-1 Receptor, *The journal of immunology* 1998

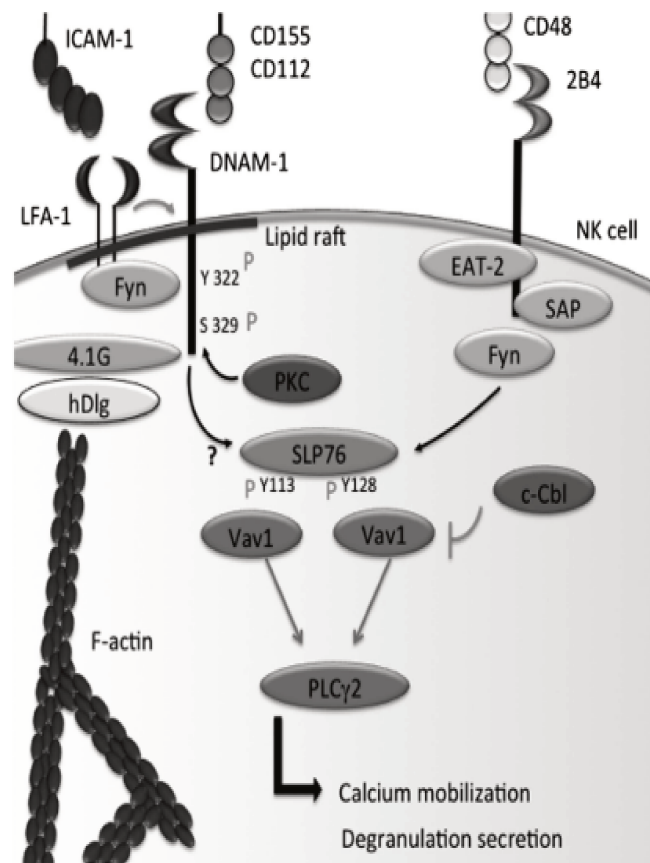
signalisation intracellulaires (Sherrington et al., 1997; A. Shibuya et al., 1996) (Figure 29).

Au sein des cellules NK et des lymphocytes T activés par le TCR, la PKC phosphoryle la sérine 329 de CD226 (S329 chez l'Homme et S326 chez la souris) afin d'augmenter l'adhésion de CD226 vis-à-vis de ses ligands exprimés par les cellules cibles et ainsi transduire le signal impliqué dans leurs fonctions cytolytiques (A. Shibuya, Lanier, & Phillips, 1998; K. Shibuya et al., 1999). La phosphorylation de la sérine 329 joue un rôle majeur dans l'association entre CD226 et l'intégrine LFA-1 (intégrine  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ , CD11a/CD18) impliquée dans la transduction du signal de CD226 (K. Shibuya et al., 1999; Shirakawa, Shibuya, & Shibuya, 2004). En effet, l'engagement de LFA-1 induit la phosphorylation de la kinase Fyn (appartenant à la famille des kinases Scr) qui phosphoryle à son tour la tyrosine 322 de CD226 (Y319 chez la souris) (K. Shibuya et al., 1999). Le rôle de LFA-1 dans la voie de signalisation de CD226 a notamment été démontré *in vitro* sur des cellules NK issus de patients présentant un défaut d'expression de l'intégrine  $\beta\text{2}$  (syndrome



fonctions effectrices (Bryceson, March, Ljunggren, & Long, 2006). Ainsi, des études ont voulu identifier si les signaux intracellulaires issus de la stimulation de CD226 « complémentent » ceux issus d'autres récepteurs.

Chez l'Homme, l'engagement de CD226 induit la phosphorylation de la tyrosine 128 (Y128) de SLP-76 et la phosphorylation de Vav-1(Y160) (H. S. Kim & Long, 2010), et l'activation additionnelle du récepteur activateur 2B4 induit la phosphorylation de la tyrosine 113 de SLP-76 et potentialise la phosphorylation de Vav-1 (H. S. Kim & Long, 2013). Ainsi, les signaux issus de l'engagement des récepteurs CD226 et 2B4 synergisent afin de promouvoir la phosphorylation de SLP-76 sur ses deux sites putatifs reconnus par le domaine SH2 de Vav-1. La stabilisation du complexe SLP-76 /Vav-1 favorise l'activation de la PLC- $\gamma$ 2 et de Erk afin d'augmenter la mobilisation de calcium intracellulaire nécessaire à l'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK (*Figure 31*) (H. S. Kim & Long, 2013).



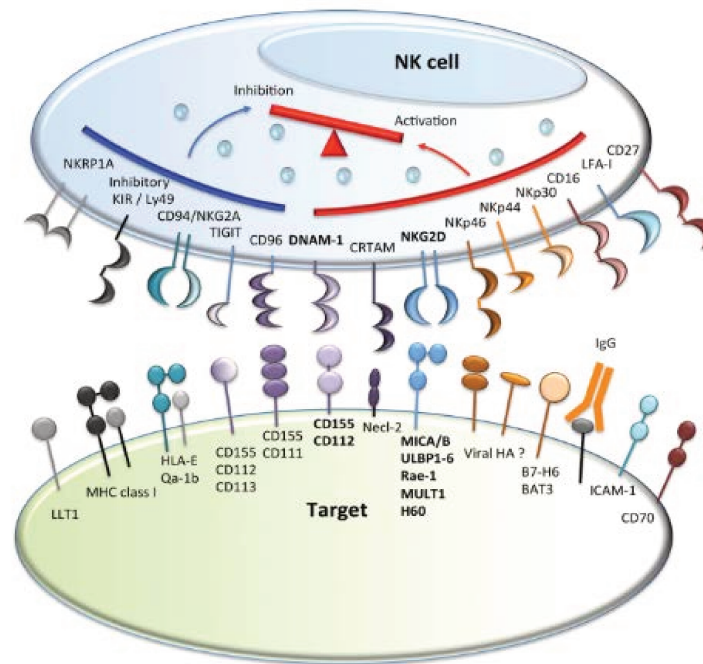
**Figure 31** : Actions synergiques de l'engagement de CD226, 2B5 et LFA-1 dans l'activation des fonctions cytolytiques des cellules NK

From Lucas Ferrari de Andrade, Mark J Smyth and Ludovic Martinet, *DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins Immunology and Cell Biology, 2014*

L'investigation de la voie de signalisation de CD226 a donc été principalement réalisée sur des cellules NK, mais une étude récente a révélé que l'engagement de CD226 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> activés par le TCR augmente la phosphorylation de la tyrosine 174 de Vav-1 et la phosphorylation de ERK (Gaud et al., 2018). CD226 est donc un récepteur capable de transduire un signal activateur via la phosphorylation de la tyrosine 322 impliquée dans les fonctions effectrices des cellules T et des cellules NK. Cependant, l'ensemble de ces études indiquent que l'activation des protéines impliquées dans la voie de signalisation de CD226 semble dépendre du type cellulaire étudié et des récepteurs immunorégulateurs exprimés à leur surface.

### 3. Rôles de CD226 dans les fonctions des cellules NK

Les cellules NK sont des lymphocytes cytotoxiques de l'immunité innée impliqués dans le contrôle précoce des infections microbiennes ainsi que dans l'immunosurveillance antitumorale (Vivier, Tomasello, Baratin, Walzer, & Ugolini, 2008). Les cellules NK jouent un rôle majeur dans la tolérance immunitaire puisqu'ils sont capables d'identifier et de lyser spécifiquement une cellule infectée ou une cellule tumorale tout en épargnant les cellules saines du soi. L'activation de leurs fonctions cytotoxiques résulte de l'intégration de signaux issus de l'engagement des récepteurs activateurs et inhibiteurs qu'ils expriment à leur surface (*Figure 32*).



**Figure 32** : Diversité des interactions entre les récepteurs des cellules NK et leurs ligands exprimés par les cellules cibles

Les cellules NK sécrètent des molécules cytolytiques (la perforine et les granzymes) qui induisent l'apoptose de la cellule cible (J. M. Kelly et al., 2001). L'apoptose des cellules tumorales peut également résulter de l'interaction entre Fas : Fas-L (Fas-Ligand) et TRAILR1/2 (TRAIL receptor 1/2) : TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) exprimés par les cellules cibles et les cellules NK, respectivement (Mark J. Smyth et al., 2004, 2005; Zamai et al., 1998).

*a) Activation des fonctions effectrices*

De nombreuses études ont mis en évidence que CD226 est une molécule d'adhésion qui augmente la sécrétion des cytokines effectrices et la cytotoxicité des cellules NK à la suite de son interaction avec CD112 et CD155 fréquemment exprimés par les cellules tumorales (Bottino et al., 2003; C. J. Chan, Smyth, & Martinet, 2014; Kearney, Ramsbottom, Voskoboinik, Darcy, & Oliaro, 2016; Pende et al., 2005; A. Shibuya et al., 1996; Tahara-Hanaoka et al., 2004). Cependant, l'interaction de CD226 avec ses ligands n'est pas nécessairement requise pour les fonctions cytolytiques des cellules NK. En effet, la contribution respective des récepteurs impliqués dans l'activation des fonctions effectrices des cellules NK (notamment 2B4, NKp30, NKp46 et NKG2D) varie selon l'expression de leurs ligands spécifiques qui caractérisent les cellules cibles (Bryceson, March, Ljunggren, Long, & Dc, 2011; Castriconi et al., 2007). Bien que la seule stimulation de CD226 induise l'augmentation du calcium intracellulaire, la costimulation CD226/2B4 est nécessaire à la dégranulation des molécules lytiques, à la sécrétion des cytokines effectrices IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  et à la lyse des cellules tumorales par les cellules NK n'ayant pas été pré-activées en IL-2 (Bryceson, Ljunggren, & Long, 2009; Bryceson et al., 2011; N. Stanietsky et al., 2009). Les contacts intercellulaires entre la cellule NK et sa cible sont initiés via l'interaction entre l'intégrine LFA-1 et ICAM-1 en périphérie de la synapse immunologique. LFA-1 interagit avec le cytosquelette d'actine afin de stabiliser les conjugués et réorganiser la localisation des différents acteurs moléculaires impliqués dans la transduction des signaux nécessaires à la polarisation et au relargage des granules lytiques (Barber, Faure, & Long, 2004; Bryceson, March, Barber, Ljunggren, & Long, 2005; Lagrue, Kennedy, Williamson, & Davis, 2013; Orange, 2008). Ainsi, l'identification du rôle de LFA-1 dans la transduction du signal issu de l'engagement de CD226 a conduit les chercheurs à caractériser davantage les mécanismes moléculaires qui régissent l'association physique et fonctionnelle entre CD226 et LFA-1 (K. Shibuya et al., 1999).

L'interaction entre le premier domaine extracellulaire de CD226 et son ligand est impliqué dans l'agrégation de CD226 et LFA-1 à la synapse immunologique et induit la transduction de signaux « inside-out » à l'origine du changement conformationnel de LFA-1 (Bryceson et al., 2009, 2005; Hou et al., 2014). Ainsi, il a été démontré que LFA-1 et CD226 coopèrent pour transduire un signal intracellulaire conduisant à la sécrétion de cytokines effectrices et de molécules lytiques vis-à-vis de lignées cellulaires (K562 et HeLa) exprimant ICAM-1 et CD112/CD155, respectivement (Hou et al., 2014). En effet, l'absence de LFA-1 à la surface des cellules NK (issues de patients atteints du syndrome de déficit d'adhésion des leucocytes) ou l'inhibition de l'interaction entre LFA-1 et son ligand ICAM-1 inhibe la lyse de cibles tumorales induite par l'engagement de CD226 (K. Shibuya et al., 1999; Tahara-Hanaoka et al., 2004). Il a été suggéré plus récemment que l'adhésion entre LFA-1 et ICAM-1 est nécessaire au recrutement et à la polarisation de CD226 à la synapse immunologique, qui est d'autant plus renforcée à la suite de l'interaction entre CD226 avec ses ligands (Enqvist et al., 2015). L'ensemble de ces études suggèrent que suite aux interactions initiales entre LFA-1 et ICAM-1, CD226 interagit avec LFA-1 pour favoriser la formation d'une synapse immunologique mature nécessaire à la transduction de signaux activateurs impliqués dans les fonctions cytotoxiques des cellules NK.

*b) Rôle de CD226 dans « l'éducation » des cellules NK*

« L'éducation » des cellules NK est un processus biologique de différenciation fonctionnelle nécessaire à leurs capacités de reconnaissance des molécules du CMH-I exprimées par toutes les cellules de l'organisme. La reconnaissance du CMH-I par les récepteurs inhibiteurs des cellules NK inhibe leurs fonctions cytotoxiques vis-à-vis des cellules du soi, et permet ainsi de maintenir efficacement la tolérance immunitaire (Vitale et al., 2002). Les cellules NK « éduquées » sont ainsi capables de lyser spécifiquement les cellules présentant un défaut d'expression du CMH-I, telles que les cellules infectées et les cellules tumorales. Afin de caractériser davantage les cellules NK « éduquées » chez l'Homme, des analyses phénotypiques et fonctionnelles ont été réalisées sur des cellules NK du sang circulant de donneurs sains (Anfossi et al., 2006).

Les cellules NK présentant des défauts de sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de dégranulation de molécules lytiques vis-à-vis d'une cible n'exprimant pas le CMH-I (lignée cellulaire érythroleucémique K562a) n'expriment quasiment pas les récepteurs inhibiteurs KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like receptors) (Ly49 A/C/G/I chez la souris) et CD94/NKG2A. De façon importante, ces cellules NK expriment également moins CD226 que les cellules NK KIR<sup>+</sup> NK2GA<sup>+</sup>. Des travaux ont par ailleurs confirmé que le niveau d'expression de CD226 est positivement corrélé au nombre de récepteurs inhibiteurs KIR et NKG2A exprimés à la surface des cellules NK circulantes (Enqvist et al., 2015). Chez la souris, CD226 est exprimé progressivement par les cellules NK au cours de leur différenciation dans la moelle osseuse puis diminue dans les stades plus tardifs lors de leur migration dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires (Martinet et al., 2015; Wagner et al., 2017). Ainsi, CD226 identifie deux populations de cellules NK différentes : les NK CD226<sup>bright</sup> (CD226<sup>+</sup>) se différencient irréversiblement en cellules NK CD226<sup>dull</sup> (CD226<sup>-</sup>), et ce indépendamment du stade de maturation (Martinet et al., 2015). L'absence d'un quelconque défaut de développement des cellules NK issues de souris CD226<sup>-/-</sup> ainsi qu'un profil très similaire de l'expression des marqueurs de maturation des cellules NK (CD27 et CD11b) chez des souris sauvages suggèrent que CD226 n'est pas nécessairement requis pour la maturation des cellules NK (Gilfillan et al., 2008; S. Seth et al., 2009). De façon similaire à ce qu'il a été démontré chez l'Homme, la fréquence des cellules NK CD226<sup>+</sup> est proportionnelle au nombre de récepteurs inhibiteurs Ly49r et les cellules NK CD226<sup>-</sup> expriment moins le récepteur inhibiteur NKG2A (S. Seth et al., 2009). L'analyse des caractéristiques fonctionnelles a révélé que les cellules NK CD226<sup>-</sup> activées sécrètent significativement moins d'IFN- $\gamma$  (S. Seth et al., 2009) mais sont cependant capables de reconnaître et lyser spécifiquement des cellules cibles n'exprimant pas le CMH-I (Wagner et al., 2017). Ainsi, l'expression de CD226 semble être positivement corrélée au « degré d'éducation » des cellules NK mais n'est pas nécessairement requise pour l'activation de leurs fonctions cytolytiques (Wagner et al., 2017).



c) *CD226 identifie deux populations de cellules NK aux fonctions différentes*

Chez la souris, une analyse plus approfondie des propriétés fonctionnelles des NK CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> *in vitro* a permis de mettre en évidence que les NK CD226<sup>+</sup> activées sécrètent significativement plus de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-6 et CCL5) et prolifèrent davantage que les NK CD226<sup>-</sup> (Martinet et al., 2015). Les capacités lytiques des cellules NK CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> étant relativement identiques vis-à-vis d'une cible tumorale dépendante du récepteur NKG2D (lignées de lymphomes YAC-1 et RMA), il a donc été suggéré que CD226 n'est pas impliqué dans l'activation des fonctions cytotoxiques des cellules NK (Martinet et al., 2015). Cependant, si les cellules cibles n'expriment pas le ligand NKG2D mais au contraire expriment CD155 (telles que les lignées cellulaires de mélanome B16F10), les cellules NK CD226<sup>-</sup> ont des capacités lytiques significativement plus faibles que les NK CD226<sup>+</sup> (J. S. Kim et al., 2017; Lakshmikanth et al., 2009). La diminution des capacités lytiques des NK CD226<sup>-</sup> vis-à-vis des cellules de mélanome semble résulter de leur faible capacité à stabiliser de façon pérenne les contacts intercellulaires (J. S. Kim et al., 2017). Conformément aux résultats décrits plus haut dans ce manuscrit, CD226 est donc un récepteur activateur des fonctions cytotoxiques des cellules NK qui n'est cependant pas nécessairement requis pour lyser toutes les cellules tumorales.

Afin d'identifier quelles pouvaient être les conséquences de l'hypofonctionnalité des NK CD226<sup>-</sup> dans un contexte antitumoral *in vivo*, les cellules NK CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> issus de souris naïves ont été transférées dans des souris porteuses de mélanome (modèle B16F10) ou de lymphome (RMA-S). Contrairement aux cellules NK CD226<sup>-</sup>, les cellules NK CD226<sup>+</sup> possèdent des fonctions antitumorales bien plus importantes puisqu'elles conduisent à la régression presque totale de métastases. Les fonctions effectrices des cellules NK CD226<sup>+</sup> étant indépendantes de l'engagement de CD226, il a été suggéré que les deux types cellulaires ont des programmes génétiques distincts. En effet, l'analyse du profil transcriptomique des cellules NK CD226<sup>+</sup> et CD226<sup>-</sup> a révélé que les cellules NK CD226<sup>+</sup> sont caractérisées par l'expression de gènes spécifiques de la voie de signalisation de l'IL-15 associés au métabolisme, au cycle cellulaire et à la production de cytokines pro-inflammatoires (Martinet et al., 2015).

La disparité des profils génétiques entre les cellules NK CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> semble être confirmée par des travaux ayant quantifié le taux d'ARNm codant CD226 qui indiquent que la différence d'expression de CD226 ne résulte pas d'une internalisation du récepteur mais résulte plutôt d'un programme génétique distinct (S. Seth et al., 2009). Ainsi, CD226 semble être un marqueur de différenciation des cellules NK « éduquées » qui identifie à la fois chez l'Homme et chez la souris des cellules NK aux fonctions effectrices plus importantes.

Chez l'Homme, la majorité des cellules NK du sang circulant expriment faiblement le marqueur membranaire CD56 (CD56<sup>dim</sup>) et sont caractérisées par des propriétés cytotoxiques accrues au vu de leur forte expression du récepteur activateur CD16 et des granzymes B (Cooper, Fehniger, & Caligiuri, 2001). Cependant, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> ont des capacités prolifératives plus faibles et sécrètent moins de cytokines effectrices (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et GM-CSF) que les NK CD56<sup>bright</sup> exprimant de forts niveaux de CD56. De façon identique aux populations NK CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> chez la souris, CD226 identifie également des populations de cellules NK aux programmes transcriptionnels distincts et aux fonctions effectrices différentes chez l'Homme : les NK CD56<sup>bright</sup> CD226<sup>+</sup>, les NK CD56<sup>dim</sup> CD226<sup>+</sup> et les NK CD56<sup>dim</sup> CD226<sup>-</sup> (Stannard, Waterhouse, Vari, Chatenoud, & Gandhi, 2019). Ces études suggèrent que l'expression de CD226 est associée à programme génétique fonctionnel et que la perte progressive de CD226 identifie des cellules NK hyporépondeuses en différenciation terminale. Les tests fonctionnels réalisés *in vitro* sur des cellules de NK circulants de donneurs sains ont indiqué que les NK CD56<sup>bright</sup> CD226<sup>+</sup> « immatures » expriment de nombreux récepteurs aux cytokines qui leur permettent de proliférer suite à leur stimulation en présence d'IL-2. Ils se différencient en cellules NK CD56<sup>dim</sup> CD226<sup>+</sup> aux fonctions effectrices et cytotoxiques accrues, capables de se différencier à leur tour en cellules « terminales » NK CD56<sup>dim</sup> CD226<sup>-</sup>. Les NK CD56<sup>dim</sup> CD226<sup>-</sup> ont une mobilité réduite, prolifèrent peu et sécrètent de faibles quantités de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  et le GM-CSF. L'augmentation de la fréquence de NK CD56<sup>dim</sup> CD226<sup>-</sup> aux propriétés cytotoxiques altérées dans le sang de patients atteints de lymphome suggère que ces cellules NK peuvent éventuellement limiter l'efficacité des immunothérapies antitumorales et ainsi représenter des cellules dont la fréquence pourrait prédire les réponses cliniques des patients.

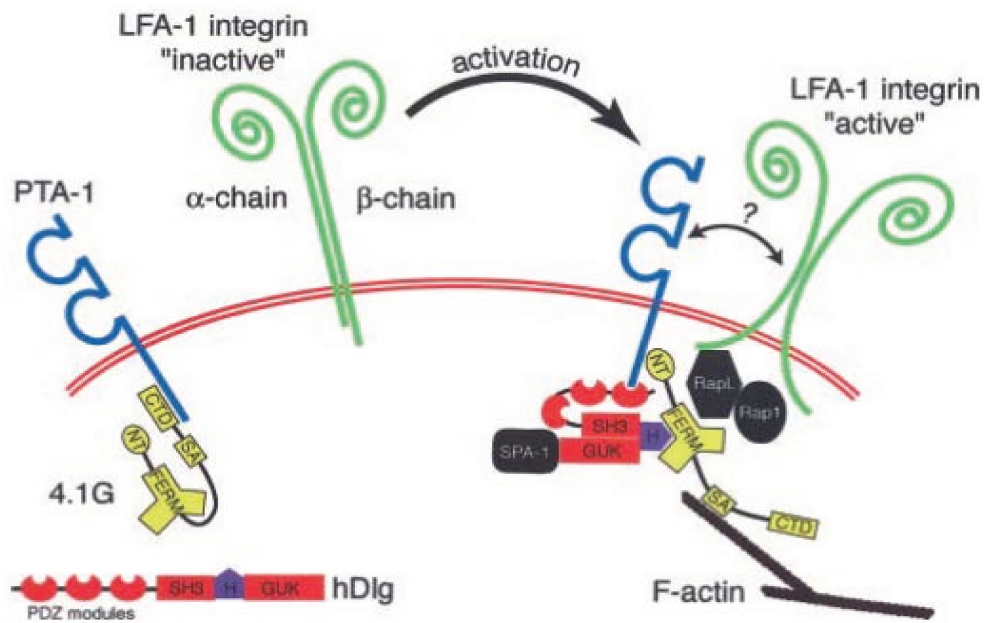
d) *Rôle de CD226 dans la régulation des fonctions des cellules dendritiques*

Les cellules NK jouent un rôle majeur dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative puisqu'ils sont capables de réguler les fonctions des cellules dendritiques (CD) et promouvoir le développement de LT CD4<sup>+</sup> pro-inflammatoires (LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub>) et l'activation des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Chez l'Homme et chez la souris, de nombreuses études ont révélé la complexité des interactions bidirectionnelles entre les cellules NK et les cellules dendritiques (DC). Elles favorisent d'une part leurs activations réciproques mais peuvent également conduire à l'apoptose des cellules dendritiques matures ou immatures (Ferlazzo et al., 2002; Pende et al., 2006; Piccioli, Sbrana, Melandri, & Valiante, 2002; Vitale et al., 2005; Walzer, Dalod, Robbins, Zitvogel, & Vivier, 2005). En effet, des études réalisées *in vitro* sur des cellules humaines ont indiqué que les interactions entre les DC matures et les cellules NK activent la sécrétion d'IL-12 par les DC, et que l'IL-12 stimule la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK (Borg et al., 2004). Bien qu'il ait été indiqué que ces deux cytokines ne soient pas nécessaires aux propriétés antitumorales des cellules NK *in vivo* (Fernandez et al., 1999), elles jouent un rôle important dans la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub> pro-inflammatoires ainsi que dans l'acquisition des propriétés effectrices des LT CD8<sup>+</sup> (Mailliard et al., 2003; Martín-Fontecha et al., 2004).

Ainsi, les DC contribuent indirectement à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative via l'activation des cellules NK. Cependant, les cellules NK activées par les DC peuvent à leur tour réguler les fonctions des DC. Tandis que l'engagement du récepteur activateur Nkp30 augmente la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  pour favoriser la maturation des DC (Vitale et al., 2005), il induit également l'apoptose des DC immatures ou matures (Ferlazzo et al., 2002) en coopération avec CD226 qui interagit avec CD112 et CD155 exprimés à leur surface (Kamran et al., 2013; Pende et al., 2006; S. Seth et al., 2009). Ces études indiquent donc que CD226, ainsi que d'autres récepteurs activateurs des cellules NK, régulent « l'editing » des cellules dendritiques afin de favoriser la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace.

#### 4. Rôle de CD226 dans les fonctions des lymphocytes T

Au vu de l'association physique et fonctionnelle entre CD226 et LFA-1 dans les lymphocytes T activés par le TCR (K. Shibuya et al., 1999), il a été suggéré que CD226 est impliqué dans les processus d'adhésion au cours de l'activation lymphocytaire. Des expériences réalisées sur des cellules T (Jurkat) ont en effet indiqué que la protéine 4.1G constitutivement associée au domaine cytoplasmique de CD226 change de conformation pour interagir avec la protéine DLG1 (Discs Large Homolog 1) et le cytosquelette d'actine. DLG1 est une protéine appartenant à la famille des protéines MAGUK, qui constituent des protéines importantes impliquées dans la clusterisation des récepteurs de signalisation au sein des cellules T activées (Hara et al., 2003). Par ailleurs, l'activation du TCR conduit à la polarisation des rafts lipidiques contenant le complexe protéique LFA-1/CD226 au niveau de la surface de contact entre le lymphocyte T et la cellule cible présentatrice d'antigène (Shirakawa et al., 2004). Au vu des études qui ont démontré sur des souris LFA-1<sup>-/-</sup> que LFA-1 est nécessairement requis pour le recrutement de CD226 au niveau des rafts lipidiques (Shirakawa et al., 2006), il semblerait donc que LFA-1 soit impliqué dans la réorganisation spatiale du complexe ternaire CD226/4.1G/DLG1 (*Figure 33*) (Monks, Freiberg, Kupfer, Sciaky, & Kupfer, 1998; Ralston et al., 2004; K. Shibuya et al., 2003; Shirakawa et al., 2004). CD226 semble donc jouer un rôle important dans l'organisation structurale et fonctionnelle de la synapse immunologique afin d'optimiser la transduction des signaux intracellulaires et l'activation des cellules T (Hara et al., 2003).



**Figure 33 :** Modèle des interactions dynamiques entre CD226, LFA-1 et le cytosquelette d'actine suite à l'activation des lymphocytes T

From Ralston, Kylie J. et al, *The LFA-1-associated molecule PTA-1 (CD226) on T cells forms a dynamic molecular complex with protein 4.1G and human discs large*, *The Journal of Biological Chemistry* 2004

Au niveau des rafts lipidiques des lymphocytes T non activés, il est suggéré que CD226 interagit constitutivement avec le domaine C-terminal de la protéine de liaison au cytosquelette d'actine 4.1G. Aussi, CD226 contient dans sa partie cytoplasmique C-terminale une séquence consensus KTRV qui lui permet de lier le domaine PDZ de la protéine hDlg1 ( human Disc Large 1). Suite à l'activation des lymphocytes T JURKAT, CD226 interagit avec le domaine N-terminal de 4.1G. Les mécanismes à l'origine de cette association ne sont pas encore définis mais il est supposé que (i) l'interaction de CD226 avec hDlg favorise l'association de CD226 à 4.1G ou que (iii) le changement conformationnel de protéines interagissant avec CD226 « libère » CD226 qui s'associe ultérieurement à la partie N-T de 4.1.G. Ainsi, ces associations dynamiques seraient à l'origine de la formation d'un complexe protéique d'adhésion, essentiel à la clusterisation et aux fonctions des LFA-1.

#### a) Rôle de CD226 dans les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup>

L'expression de CD226 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> a été initialement identifiée comme jouant un rôle majeur dans la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs (Burns, Triglia, Werkmeister, Begley, & Boyd, 1985), puis caractérisé quelques années plus tard comme une molécule d'adhésion impliquée dans les fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> (A. Shibuya et al., 1996). Des évidences expérimentales ont en effet indiqué que le blocage de l'interaction entre CD226 et ses ligands exprimés par les cellules cibles diminue sensiblement la lyse de lignées tumorales exprimant le CMH-I ainsi que la sécrétion de TNF- $\alpha$  et de GM-CSF par les LT CD8<sup>+</sup> activés (A. Shibuya et al., 1996).

Afin de caractériser davantage le rôle de CD226 dans la génération des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs *in vivo*, des études réalisées sur des souris CD226<sup>-/-</sup> ont mis en évidence que contrairement au récepteur costimulateur CD28, CD226 n'est pas nécessaire au développement des LT CD8<sup>+</sup> (Gilfillan et al., 2008; Iguchi-Manaka et al., 2008) mais qu'il stimule leurs fonctions cytotoxiques en interagissant avec ses ligands CD112 et CD155 exprimés par les cellules cibles (Iguchi-Manaka et al., 2008). Gilfillan *et al* ont également comparé l'activation des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'ovalbumine (LT CD8<sup>+</sup> OT-1) issus de souris WT et CD226<sup>-/-</sup> en réponse à une stimulation par des cellules dendritiques matures ou des cellules tumorales exprimant CD155 « pulsées » avec l'ovalbumine. Ces travaux ont indiqué que l'absence de CD226 n'affecte pas l'expansion clonale des LT CD8<sup>+</sup> spécifique de l'antigène au cours du « priming » mais qu'elle diminue sensiblement leur cytotoxicité vis-à-vis de cibles tumorales, *in vitro* et *in vivo* (Gilfillan et al., 2008). Une étude a effectivement affirmé que le récepteur CD226 optimise la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> naïfs activés par le TCR et leur sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$ , et qu'il est nécessaire à la lyse de cellules tumorales (Ramsbottom et al., 2014). Au vu des travaux ayant suggéré que CD226 joue un rôle important dans la formation d'une synapse immunologique mature, Ramsbottom et al ont donc analysé par microscopie à fluorescence la capacité de LT CD8<sup>+</sup> issus de souris CD226<sup>-/-</sup> à interagir avec leurs cibles tumorales. Les évidences expérimentales ont indiqué que la diminution des capacités lytiques des LT CD8<sup>+</sup> n'exprimant pas CD226 résulte de l'altération de la polarisation des rafts lipidiques et du recrutement de LFA-1 au niveau de l'interface de contact avec les cellules cibles (Ramsbottom et al., 2014). Ainsi, ces études semblent confirmer le rôle majeur de CD226 dans le réarrangement spatial des acteurs moléculaires impliqués dans la sécrétion des granules lytiques au niveau de la synapse immunologique des LT CD8<sup>+</sup>.

#### b) *Rôle de CD226 dans les fonctions effectrices des LT CD4<sup>+</sup>*

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont des lymphocytes de l'immunité adaptative qui jouent également un rôle clé dans la réponse immunitaire antitumorale. Dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT CD4<sup>+</sup> naïfs reconnaissent par l'intermédiaire de leur TCR le complexe CMH-II : peptide exprimé par les cellules dendritiques matures. De façon similaire aux LT CD8<sup>+</sup>, leur différenciation effectrice est régulée par des récepteurs coactivateurs et coinhibiteurs, ainsi que par les cytokines sécrétées par les CPA, les cellules NK et les macrophages (Zhu, Yamane, & Paul, 2010).



Au cours de leur expansion clonale, les CD4<sup>+</sup> activés se polarisent principalement en LT CD4<sup>+</sup> effecteurs T<sub>H1</sub>, en LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H2</sub> et en LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H17</sub>. Au vu de leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et les chimiokines MIP-1 $\alpha$  (CCL3) et MIP-1 $\beta$  (CCL4) impliquées dans la migration des cellules T au site de l'inflammation, les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs T<sub>H1</sub> sont généralement considérés comme étant des lymphocytes T anti-tumoraux. Les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs T<sub>H2</sub> sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 et jouent un rôle majeur dans la coordination de la mise en place de l'immunité humorale et les réponses allergiques inflammatoires (Dobrzanski, 2013). Les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs T<sub>H17</sub> sécrètent de l'IL-17, de l'IL-21, de l'IL-22, et de l'IL-26. Ils sont impliqués dans de nombreux processus inflammatoires mais leurs rôles dans les réponses antitumorales restent actuellement controversés (Wilke, Bishop, Fox, & Zou, 2011). Ainsi, l'identification des récepteurs membranaires impliqués dans l'activation, la différenciation et les fonctions des différents LT CD4<sup>+</sup> est une approche nécessaire à la conception et au développement de nouvelles approches immunothérapeutiques.

Chez la souris, il a été initialement démontré *in vitro* que la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub> est associée à l'augmentation de l'expression de CD226 à la suite de l'activation du TCR tandis que l'expression de CD226 est fortement diminuée à la surface des LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H2</sub> (Dardalhon et al., 2005). CD226 semble jouer un rôle important dans l'acquisition des propriétés fonctionnelles des LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub> puisque l'injection d'un anticorps bloquant CD226 (anti-CD226) chez des souris préalablement immunisées avec un peptide favorisant la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub> diminue la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub> ainsi que leur sécrétion d'IFN- $\gamma$ . De façon intéressante, il a été révélé que CD226 est également exprimé à la surface d'un certain type de cellules dendritiques exprimant CD8 (CD8 $\alpha$ ) et que son engagement augmente leur sécrétion d'IL-12 pour favoriser la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> en LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub> (Tahara-Hanaoka et al., 2006).

Chez l'Homme, des résultats similaires ont démontré que CD226 est up-régulé à la surface des LT CD4<sup>+</sup> naïfs activés par le TCR (Lozano, Dominguez-Villar, Kuchroo, & Hafler, 2012) et qu'il est impliqué dans la transduction du signal issu de l'engagement de LFA-1 afin de promouvoir leur prolifération et leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  (K. Shibuya et al., 2003).



L'augmentation de l'expression de CD226 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> activés est associée à l'expression des facteurs de transcription Tbet et RORc impliqués respectivement dans la différenciation des LTCD4<sup>+</sup> TH1 et des LTCD4<sup>+</sup> TH17 tandis qu'elle est associée à l'inhibition des facteurs de transcription STAT-6 et GATA-3 jouant un rôle majeur dans la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> TH2 (Lozano, Joller, Cao, K. Kuchroo, & Hafler, 2013). Une étude récente a démontré que la stimulation de CD226 conduit à l'augmentation de la sécrétion de cytokines effectrices par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> stimulés par le TCR, notamment via l'activation de la protéine Vav-1 jouant un rôle clé dans la sécrétion d'IL-17 (Gaud et al., 2018). Au vu du rôle activateur de CD226 dans la prolifération et les fonctions effectrices des LT CD4<sup>+</sup> TH1 et des LTCD4<sup>+</sup> TH17, il a été révélé que le blocage de CD226 inhibe les propriétés pro-inflammatoires des LT CD4<sup>+</sup>. Ainsi, le blocage de CD226 semble constituer une stratégie thérapeutique intéressante dans le traitement des maladies auto-immunes.

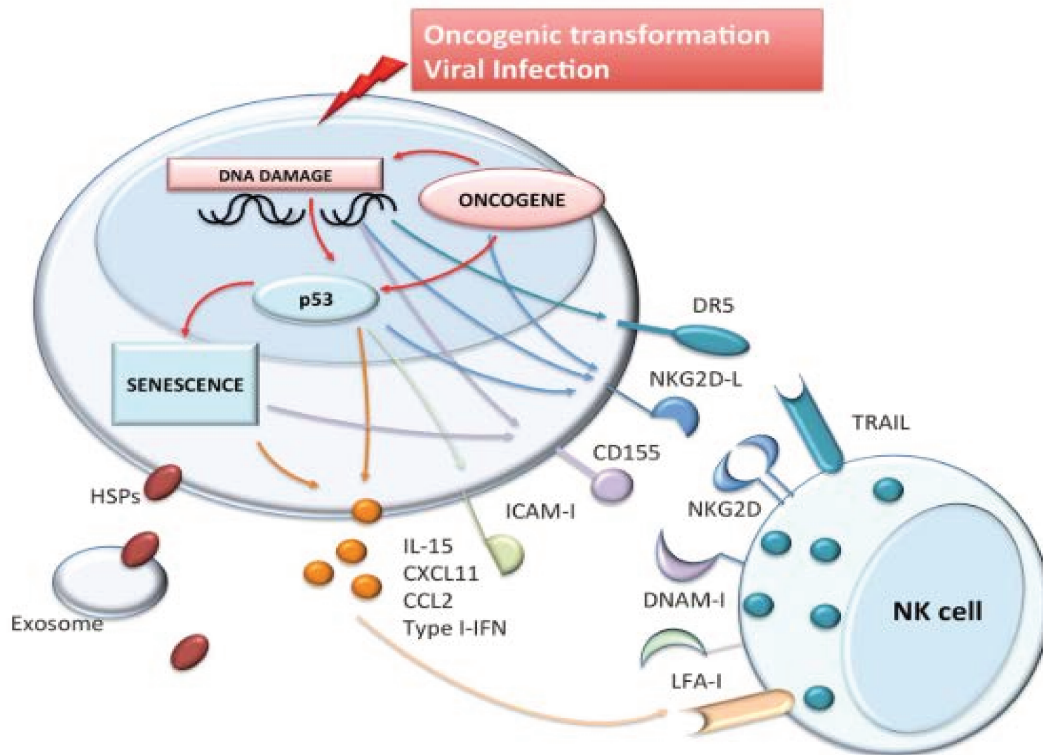
## 5. Rôle de CD226 dans l'immunosurveillance

### a) *Rôle dans l'immunosurveillance antitumorale*

#### (1) Evidences expérimentales sur des modèles murins

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un métabolisme accru et une activation de nombreux oncogènes qui conduisent à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Celles-ci constituent une source majeure de stress oxydatif qui conduit à la génération de coupures des brins d'ADN. Ainsi, la réponse aux dommages de l'ADN (DDR, DNA damage response) implique l'activation de nombreuses protéines, notamment les kinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), ATR (ATM- and Rad3-related) et la DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) qui inhibent principalement la progression du cycle cellulaire (Kurz & Lees-Miller, 2004; Lord & Ashworth, 2012). L'activation des kinases ATM et ATR conduit à la phosphorylation de nombreux substrats tels que les kinases Chk1 et Chk2 ainsi que l'histone H2AX qui induisent l'expression de « ligands de stress » tels que CD112 et CD155 (Ardolino et al., 2011; Gao, Zheng, Xin, Wang, & Zhao, 2017). Il a notamment été indiqué que la voie oncogénique Ras active la voie de signalisation Raf-MEK-ERK-AP1, à l'origine de l'augmentation de l'expression de CD155 (Ikeda et al., 2004).

Ainsi, la surexpression de CD112 et CD155 à la surface de nombreuses tumeurs solides (Mattias Carlsten et al., 2007; Castriconi et al., 2004; Masson et al., 2001) et hématopoïétiques (El-Sherbiny et al., 2007; Pende et al., 2005) ont permis de révéler *in vitro* l'importance de leur interaction avec CD226 dans les fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> et des cellules NK chez



**Figure 34** : Le stress génotoxique des cellules tumorales favorise leur reconnaissance par les cellules NK

From Chan, C. J et al *Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress*, Cell Death & Differentiation 2014

La transformation oncogénique d'une cellule tumorale induit l'apparition de nombreuses lésions de l'ADN principalement détectées par les kinases ATM et ATR. Celles-ci sont à l'origine de la surexpression de récepteurs à la surface des cellules tumorales qui suite à leurs interactions respectives avec leurs ligands exprimés par les cellules NK, conduisent à leur apoptose. Ainsi, le récepteur DR5 interagit avec TRAIL et CD155 interagit avec CD226. Les protéines ATM et ATR sont également impliquées dans la phosphorylation de la protéine p53, qui induit notamment l'expression du ligand activateur de NKG2D, NKG2D-L. La protéine p53 induit également la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines.

l'Homme (Figure 34).

De façon intéressante, des expériences réalisées *in vitro* sur des cellules tumorales de patients atteints de myélome multiple (MM) et *in vivo* sur le modèle de la maladie Vk\*MYC ont indiqué que les traitements anti-MM (melphalan, doxorubicine, bortezomibe) induisent un stress génotoxique qui conduit à la surexpression de CD112 et CD155 à la surface des cellules

cancéreuses (Soriani et al., 2009). Des souris CD226 KO (CD226<sup>-/-</sup>) ont par la suite permis d'identifier *in vivo* le rôle de CD226 dans l'immunosurveillance antitumorale.

Les expériences initiales ont été réalisées en injectant des lignées tumorales de fibrosarcome exprimant CD112 et/ou CD155 ainsi que des agents chimiques carcinogènes (MCA et DMBA) dans des souris sauvages (WT) ou CD226<sup>-/-</sup> (Iguchi-Manaka et al., 2008). Ces travaux ont révélé que CD226 permet d'éradiquer efficacement les cellules tumorales chez plus de 50% des souris et qu'il joue un rôle majeur dans le contrôle de la progression de tumeurs primaires et dans l'amélioration de la survie de souris malades. De nombreux modèles de cancers solides (mélanome B16F10, cancer du côlon MC38 ) (Christopher J. Chan et al., 2014; Gilfillan et al., 2008; Lakshmikanth et al., 2009) et hématopoïétiques (lymphome RMA et myélome multiple Vk\*MYC) (Guillerey et al., 2015; Tahara-Hanaoka et al., 2006) ont permis de conforter le rôle majeur de CD226 dans le contrôle de la croissance tumorale et la diminution du nombre de métastases. Ces modèles ont mis évidence que l'absence de CD226 (CD226<sup>-/-</sup>) ou le blocage de CD226 (Lakshmikanth et al., 2009) diminue significativement les fonctions lytiques et effectrices des LT CD8<sup>+</sup> et des cellules NK (sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de perforine) contribuant ainsi à l'augmentation de la charge tumorale et la diminution de la survie des souris. Suite à l'observation d'une surexpression de CD155 à la surface des cellules tumorales induite par les chimiothérapies (Soriani et al., 2009), il semblerait donc que ces traitements augmentent sensiblement leur immunogénicité et favorise leur élimination par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les cellules NK exprimant CD226 (Guillerey et al., 2015). Ainsi, le modèle murin du myélome multiple Vk\*MYC a en effet indiqué que les souris CD226<sup>-/-</sup> répondent moins bien aux thérapies utilisées couramment pour traiter le myélome multiple (bortezomibe et cyclophosphamide). CD226 joue donc un rôle majeur dans l'immunosurveillance antitumorale en augmentant la cytotoxicité des LT CD8<sup>+</sup> et des cellules NK vis-à-vis de cibles tumorales surexprimant ses ligands.

De façon importante, CD226 s'avère être un récepteur majeur impliqué dans la réponse aux immunothérapies antitumorales. Un modèle murin du cancer du côlon (MC38) a en effet révélé que le blocage de PD-1 (anti-PD-1) augmente l'expression de CD226 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux et des LT CD8<sup>+</sup> spléniques spécifiques de la tumeur, d'autant plus importante à la suite de la stimulation du récepteur coactivateur GITR (B. Wang et al., 2018). L'augmentation significative de l'expression de CD226 est associée à l'augmentation de la fréquence des LT CD8<sup>+</sup> au site tumoral, ainsi qu'à la diminution de la taille des tumeurs et une prolongation de la survie de la majorité des souris traitées avec les anti-PD-1/anti-GITR. Ces travaux indiquent que de

façon similaire à CD28, CD226 est une cible majeure de la voie de signalisation inhibitrice de PD-1.

Des tests fonctionnels réalisés *in vitro* ont en effet indiqué que contrairement aux LT CD8<sup>+</sup> des souris non traitées, le domaine cytoplasmique de CD226 est phosphorylé. Ainsi, PD-1 régule négativement les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> via la déphosphorylation du domaine cytoplasmique de CD226 par la phosphatase SHP2.

## (2) Rôle pronostic de l'expression de CD155 dans les tumeurs

CD155 ayant été initialement décrite comme une molécule jouant un rôle majeur dans l'augmentation de la migration cellulaire (Sloan et al., 2004), de nombreuses études ont suggéré que sa surexpression par les tumeurs est favorable à la tumorigenèse et constitue un facteur de mauvais pronostic. En effet, des études réalisées sur des patients atteints de cancer de la prostate et de cholangiocarcinome ont révélé que la surexpression de CD155 par les cellules cancéreuses est inversement corrélée à la fréquence de lymphocytes infiltrant les tumeurs et favorise la croissance tumorale en augmentant la vascularisation de la tumeur et la migration des cellules tumorales (M. Huang, 2017; Nishiwada et al., 2015). Des expériences de transfert adoptif ont initialement démontré que l'expression de CD226 à la surface de LT injectés chez des souris CD155<sup>-/-</sup> est rapidement up-régulée, et qu'inversement elle est diminuée à la surface des LT injectés chez des souris sauvages (WT) (Sebastian Seth et al., 2011). Ces travaux ont mis en évidence *in vivo* que l'expression de CD226 à la surface des LT est réduite à la suite de son interaction avec CD155 exprimé par les cellules dendritiques. De façon intéressante, une étude récente a démontré via l'utilisation des modèles transplantables de tumeurs métastatiques (mélanomes B16F10 et SM1WT1, et carcinome MC38) que l'expression de CD155 par les cellules tumorales transplantées et par les cellules des souris hôtes induit une diminution de l'expression de CD226 (X. Li et al., 2018). Il est donc suggéré dans ces travaux que suite à l'interaction entre CD226 et CD155, la diminution de l'expression de CD226 altère les capacités cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> et des cellules NK à contrôler la croissance tumorale et le nombre de métastases, respectivement.

Chez l'Homme, des tests fonctionnels *in vitro* réalisés sur des cellules de patients atteints de carcinome ovarien ont également indiqué que l'expression de CD226 à la surface des cellules NK est diminuée à la suite de son interaction avec CD155 exprimé par les cellules tumorales. Il a

donc été suggéré dans cette étude que la diminution de l'expression de CD226 est à l'origine d'une diminution des fonctions antitumorales des cellules NK (M. Carlsten et al., 2009).

Des analyses cliniques et immunophénotypiques réalisées sur des cellules de patients atteints du pancréas ont conduit à supposer que la forte expression de CD155 par les cellules tumorales joue un rôle majeur dans la diminution de la fréquence des cellules NK et des lymphocytes infiltrant la tumeur (Nishiwada et al., 2015; Peng, Xi, Zhu, Yin, & Wei, 2016). Bien que l'expression de CD155 par les cellules tumorales dans le cancer du pancréas soit corrélée à une diminution de la survie globale des patients, elle est associée à l'augmentation de la fréquence des cellules NK infiltrant les tumeurs et à l'amélioration de la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein (Triki et al., 2019). Ainsi, le rôle pronostic de CD155 exprimé par les tumeurs dans la survie des patients est toujours difficile à évaluer et semble dépendre du type de cancer.

#### *b) Rôle de CD226 dans l'auto-immunité*

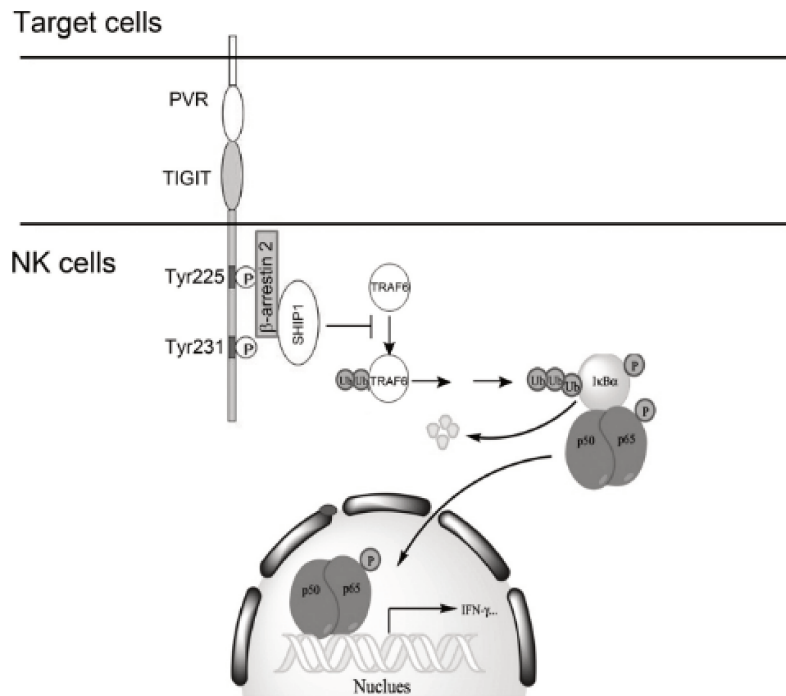
Au vu du rôle de CD226 dans l'acquisition des propriétés effectrices des LT CD4<sup>+</sup> TH1, son éventuelle implication dans le développement de maladies auto-immunes a été investiguée. Des expériences de transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> TH1 dans des souris déficientes en lymphocytes T et B (RAG2<sup>-/-</sup>) ont initialement démontré qu'un traitement relativement long avec un anticorps bloquant CD226 retarde le développement de sclérose en plaque et diminue sa sévérité (Dardalhon et al., 2005). Conformément aux études statistiques ayant indiqué une corrélation importante entre le développement du diabète de type I et le polymorphisme G307S du domaine intracytoplasmique de CD226, il a également été prouvé que ce polymorphisme est un marqueur de prédisposition au développement de l'arthrite rhumatoïde et de maladies auto-immunes de la thyroïde (Hafler et al., 2009; Qian et al., 2010; Qiu, Zhang, Qiu, Zhou, & Li, 2013). La capacité d'un anticorps monoclonal antagoniste anti-CD226 à inhiber la prolifération de LT CD4<sup>+</sup> issus de patients atteints de sclérose en plaque et de diabète de type I semble indiquer que l'interaction entre CD226 et ses ligands est une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des maladies auto-immunes (Lozano et al., 2013). Par ailleurs, une étude récente a révélé que le polymorphisme G307S de CD226 est associé à l'augmentation de la production d'IL-17 par les LT CD4<sup>+</sup>, confirmant ainsi que CD226 semble contribuer au développement de réactions auto-immunes (Gaud et al., 2018). Suite à la découverte de l'existence de variants



Noa Stanietsky et al., 2013).

TIGIT est composé d'un court domaine extracellulaire « immunoglobuline » variable (Ig-V) relativement identique à celui de CD226, d'un domaine transmembranaire et d'une portion intracellulaire composée d'un motif ITT-like (Immunoglobulin tail tyrosine) (ITT) et d'un domaine ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) jouant un rôle majeur dans la régulation négative des fonctions lymphocytaires (N. Stanietsky et al., 2009). TIGIT interagit avec les mêmes ligands que CD226 CD112 et CD155, bien que TIGIT interagisse avec CD155 avec une plus forte affinité (constante de dissociation  $K_D = 1-3nM$ ) (Noa Stanietsky et al., 2013). La *trans*-homodimérisation (2X2 *cis*-dimères) de TIGIT et CD155 favorise l'adhésion intercellulaire et est nécessaire à la transduction des signaux résultant de leurs interactions (Stengel et al., 2012). L'interaction de TIGIT avec CD155 induit la phosphorylation des tyrosines du motif cytoplasmique ITT-like ( Y225 chez l'Homme, Y227 chez la souris) et du motif ITIM ( Y231 chez l'Homme, Y233 chez la souris) (*Figure 35*) qui sont à l'origine de la transduction de signaux inhibiteurs (Liu et al., 2013; Noa Stanietsky et al., 2013). La phosphorylation de la tyrosine Y225 (ou Y227) par les Src kinases Fyn et Lck ainsi que la présence de l'alanine au sein du motif ITT-like (YxN) sont nécessaires à l'association directe entre TIGIT et les protéines adaptatrices Grb2 et la  $\beta$ -arrestine 2 (M. Li et al., 2014; Liu et al., 2013). Ces protéines recrutent la phosphatase SHIP-1 (SH2-containing inositol phosphatase-1) qui inhibent la PI3K et la voie des MAPK, diminuant ainsi l'accumulation de PIP3 et l'activation des protéines Akt, Btk et la PLC- $\gamma$ . Par ailleurs, la SHIP-1 altère l'auto-ubiquitination de TRAF-6 qui inhibe l'activité du facteur de transcription NF $\kappa$ B (*Figure 36*) (M. Li et al., 2014).





**Figure 36 :** TIGIT inhibe l'activation du facteur de transcription NFκB en inhibant l'auto-ubiquitination de TRAF-6

From M. Li et al *T-cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Receptor/ Poliovirus Receptor (PVR) Ligand Engagement Suppresses Interferon-γ Production of Natural Killer Cells via β-Arrestin 2-mediated Negative Signaling* *The journal of biological chemistry*, 2014

Bien que la voie de signalisation dépendante du motif ITIM n'ait pas été caractérisée pour TIGIT, on suppose qu'elle est similaire à celle des autres récepteurs inhibiteurs. La tyrosine phosphorylée du motif ITIM lie les domaines SH2 des phosphatases SHP1 et SHP2, qui déphosphorylent l'ensemble des tyrosines des récepteurs impliquées dans la transduction des signaux activateurs des lymphocytes T (notamment les motifs ITAMs des chaînes CD3ζ du TCR) et des cellules NK ( récepteurs activateurs NKG2D et 2B4) (Long, 2008).

## (2) Fonctions

### Rôle de TIGIT sur les cellules NK

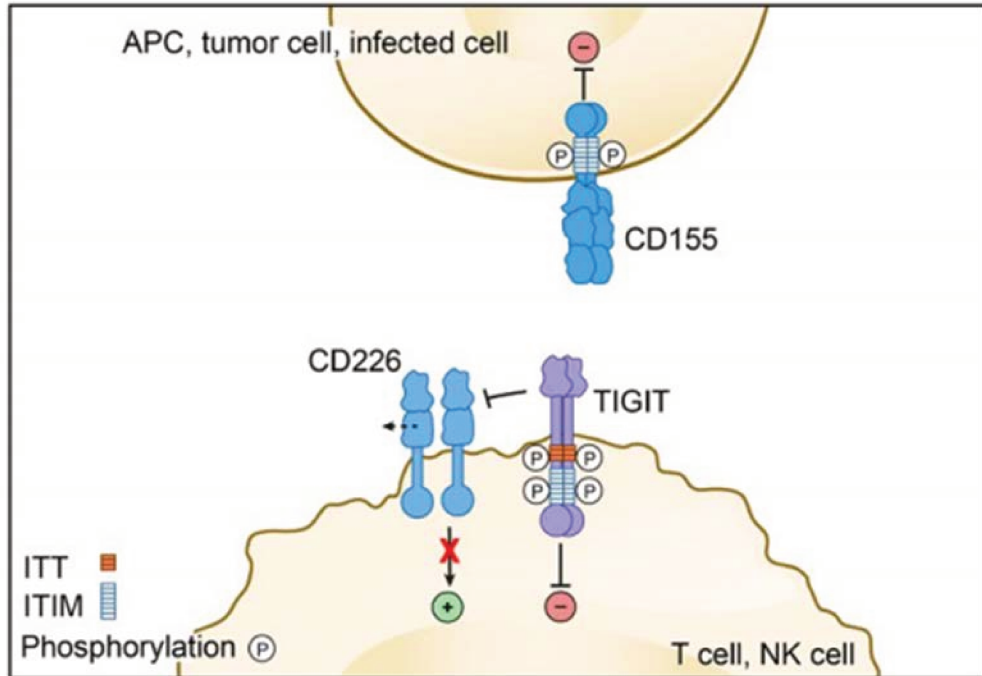
Le rôle de TIGIT dans les fonctions des cellules NK a initialement été investigué sur des cellules NK primaires issues du sang circulant de donneur sains où il a été démontré que TIGIT interagit avec CD155 pour inhiber leurs fonctions cytolytiques vis-à-vis de lignées tumorales de lymphocytes B (721.221) (N. Stanietsky et al., 2009).

Au vu de la faible capacité du seul engagement de CD226 à stimuler la cytotoxicité des cellules NK, cette étude démontre que l'effet inhibiteur de TIGIT prévaut sur les effets coactivateurs de CD226 (N. Stanietsky et al., 2009). Des expériences menées sur des cellules NK murines ont confirmé que CD155 interagit préférentiellement avec TIGIT pour inhiber leurs fonctions cytolytiques et leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  (M. Li et al., 2014; Noa Stanietsky et al., 2013) et que le signal inhibiteur nécessite la double phosphorylation des tyrosines Y227 et Y233 des motifs ITT-like et ITIM, respectivement (Noa Stanietsky et al., 2013). Bien que la diminution de l'expression de CD226 à la surface des cellules NK soit à l'origine d'une altération de leurs fonctions effectrices dans un contexte tumoral (Mattias Carlsten et al., 2009), elle inhibe davantage leur fonctionnalité en favorisant l'interaction entre TIGIT et CD155. Des expériences réalisées sur des lignées cellulaires humaines ont démontré que suite à son interaction avec CD155, TIGIT se « clusterise » au niveau de rafts lipidiques pour déstabiliser la formation du MTOC (Microtubule organization center) et altérer la polarisation des granules lytiques au niveau de la synapse immunologique (Liu et al., 2013).

#### Rôle de TIGIT sur les lymphocytes T

Il a été initialement démontré *in vitro* sur des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants d'individus sains que TIGIT interagit avec CD155 exprimé par les cellules dendritiques matures afin d'augmenter leur production d'IL-10 ( cytokine immunosuppressive) et diminuer leur sécrétion d'IL-12 nécessaire à l'acquisition de leurs propriétés effectrices (Yu et al., 2009). L'interaction entre TIGIT et CD155 diminue significativement la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> ainsi que leur production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2, dont les effets bénéfiques ont pu être démontré *in vivo* dans un modèle d'hypersensibilité retardée (maladie caractérisée par le recrutement et l'activation massive de LT CD4<sup>+</sup> TH1) (Yu et al., 2009). Ces résultats ont été confirmés par la suite sur des souris KO (TIGIT<sup>-/-</sup>) où il a été indiqué que l'absence de TIGIT induit une hyperprolifération des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques et dans la rate des souris (N. Joller et al., 2011). Ainsi, TIGIT inhibe les fonctions des lymphocytes T pour maintenir la tolérance immunitaire et contrôler le développement de maladies auto-immunes (N. Joller et al., 2011; Levin et al., 2011).

Chez l'Homme et chez la souris, l'analyse plus exhaustive de l'impact négatif de TIGIT sur les propriétés des cellules T a indiqué que TIGIT diminue sensiblement la prolifération et les fonctions effectrices des LT en altérant la transduction des signaux issus de l'engagement du TCR, qui conduit notamment à une baisse de l'expression de CD25 et de la sécrétion d'IL-2 (N. Joller et al., 2011; Lozano et al., 2012). Cependant, l'engagement de TIGIT augmente l'expression des récepteurs aux cytokines homéostatiques et des protéines anti-apoptotiques pour maintenir leur survie (N. Joller et al., 2011). De façon importante, il est actuellement suggéré que TIGIT abaisse le seuil d'activation du TCR et inhibe les fonctions effectrices des LT en empêchant la dimérisation de CD226 nécessaire à la transduction des signaux coactivateurs (*Figure 37*) (Johnston et al., 2014; Levin et al., 2011; Lozano et al., 2012). En effet, le blocage de CD155 ou de CD226 inhibe l'augmentation de l'expression de Tbet et de l'IFN- $\gamma$  résultant de l'extinction du gène codant pour TIGIT (Lozano et al., 2012).



**Figure 37 :** TIGIT inhibe l'homodimérisation de CD226 en cis afin d'empêcher son interaction avec CD226

From W C. Dougal et al, *TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy* Immunological Review, 2017

TIGIT peut inhiber les fonctions costimulatrices de CD226 via deux mécanismes non exclusifs (i) Un phénomène de compétition pour l'interaction avec leur ligand commun CD155 à la surface des cellules tumorales inhibe l'activité de CD226. (ii) TIGIT inhibe la cis-dimérisation de CD226 qui est supposé jouer un rôle important dans ses fonctions stimulatrices. En effet, il est encore peu défini si la cis-dimérisation de CD226 est nécessaire à la transduction du signal activateur.

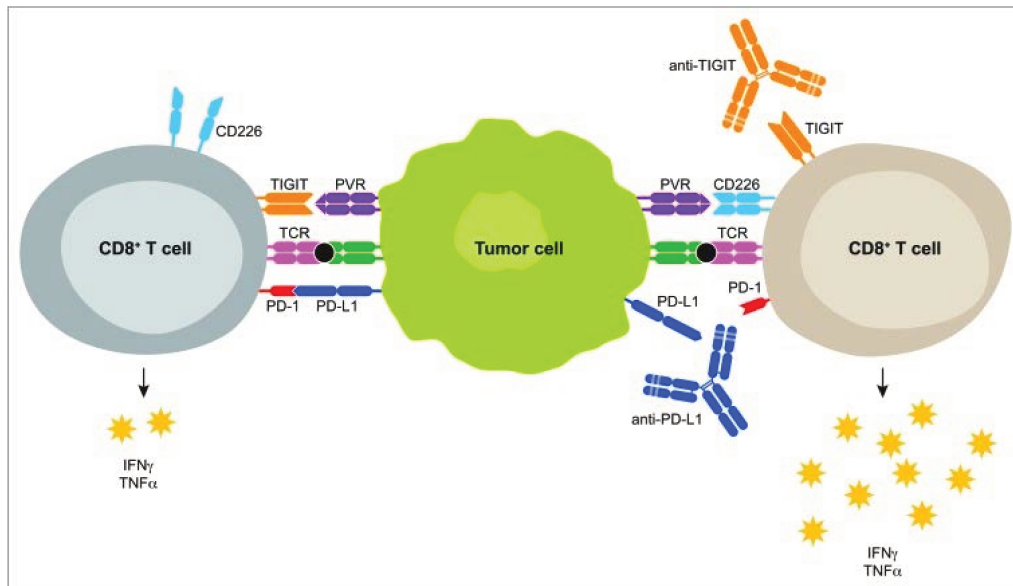
De façon similaire aux LT CD4<sup>+</sup>, TIGIT inhibe les fonctions costimulatrices de CD226 pour diminuer la prolifération, la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-2 et TNF-α), et la sécrétion de granules cytolytiques par les LT CD8<sup>+</sup> activés, aussi bien chez la souris que chez l'Homme (Johnston et al., 2014; Kurtulus et al., 2015). Contrairement aux LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> qui expriment majoritairement TIGIT à la suite à l'activation du TCR, TIGIT est exprimé de façon permanente par une partie des LT CD4<sup>+</sup><sub>reg</sub> et permet d'identifier à la fois chez l'Homme et chez la souris des LT aux propriétés immunosuppressives accrues (Fuhrman et al., 2015; N. Joller et al., 2011). L'engagement de TIGIT à la surface des LT CD4<sup>+</sup><sub>reg</sub> inhibe spécifiquement les réponses pro-inflammatoires T<sub>H1</sub> et T<sub>H17</sub> (Nicole Joller et al., 2014) et au contraire, augmente les réponses T<sub>H2</sub> (Kourepini et al., 2016). Ainsi, l'inhibition de TIGIT semble être une stratégie

thérapeutique prometteuse, à la fois dans le cancer afin de potentialiser les fonctions antitumorales des cellules NK et des LT CD8<sup>+</sup>, ainsi que dans le traitement des allergies via l'inhibition des voies T<sub>H2</sub>.

### (3) Rôle de TIGIT dans le cancer

La coexpression de TIGIT et d'autres récepteurs inhibiteurs (notamment PD-1 et Tim-3) à la surface de LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs chez des patients atteints de cancers solides (cancer du poumon non à petites cellules, cancer colorectal et mélanome) et chez des souris porteuses de tumeurs ( mélanome et cancer du sein) semble indiquer que TIGIT identifie une population de LT CD8<sup>+</sup> aux propriétés effectrices défectueuses (Chauvin et al., 2015; Johnston et al., 2014; Kurtulus et al., 2015). Des modèles expérimentaux de cancer colorectal (CT26) et du cancer du sein (EMT6) ont mis en évidence que le blocage de TIGIT, combiné avec celui de PD-1 ou PD-L1, conduit à une augmentation significative de la fréquence des LT CD8<sup>+</sup> sécrétant de l'IFN-γ et du TNF-α, aussi bien dans les tumeurs que dans les ganglions lymphatiques drainants (Johnston et al., 2014). Ainsi, la combinaison des traitements immunothérapeutiques bloquant TIGIT et PD-1/PD-L1 permet de diminuer significativement la taille des tumeurs établies et conduit à une réponse clinique totale chez la majorité des souris traitées (Johnston et al., 2014). Il a par ailleurs été démontré *in vitro* sur des LT CD8<sup>+</sup> du sang de patients atteints de mélanome métastatique que la combinaison des traitements augmente significativement la fréquence des LT CD8<sup>+</sup> proliférant et sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (Chauvin et al., 2015).

De façon importante, les fonctions de TIGIT et PD-1 dépendent de la présence de CD226 puisque le blocage de CD226 abroge la capacité du traitement anti TIGIT/PD-1 à restaurer les propriétés antitumorales des LT CD8<sup>+</sup> *in vivo*. Par ailleurs, les effets anti-tumoraux du blocage de PD-1 et de la stimulation du récepteur coactivateur GITR sont associés à l'augmentation de l'expression de CD226 et à la diminution de celle de TIGIT à la surface des LT CD8<sup>+</sup> au sein des tumeurs de souris malades (modèle MC38) (B. Wang et al., 2018). Ainsi, l'efficacité des immunothérapies semble dépendre fortement du ratio CD226/TIGIT exprimés par les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur. TIGIT est également un récepteur inhibiteur qui identifie des LT CD8<sup>+</sup> au profil « épuisé » dans les hémopathies malignes telles que le myélome multiple (MM) ou la leucémie aigüe myéloblastique (Guillerey et al., 2018; Kong et al., 2016). Aussi bien chez les patients atteints de MM que dans le modèle murin Vk\*myc, l'expression de TIGIT est associée à une diminution de la prolifération et des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> (Guillerey et al., 2018). Bloquer TIGIT restaure les fonctions antitumorales des LT CD8<sup>+</sup> et conduit à une diminution de la croissance tumorale et à une augmentation de la survie des souris malades, respectivement (Guillerey et al., 2018). Ainsi, TIGIT est un récepteur inhibiteur majeur des fonctions antitumorales des LT CD8<sup>+</sup> qui identifie chez de nombreux patients des LT CD8<sup>+</sup> dysfonctionnels. TIGIT est actuellement considéré comme un « checkpoint inhibiteur » constituant une cible thérapeutique très prometteuse des immunothérapies antitumorales puisqu'il est fortement supposé que son blocage, en combinaison éventuelle avec les anti-PD-1/PD-L1 potentialise les fonctions du récepteur CD226 (*Figure 38*).



**Figure 38 :** TIGIT limite les fonctions antitumorales des LT CD8<sup>+</sup> en limitant les interactions entre CD226 et CD155 (PVR)

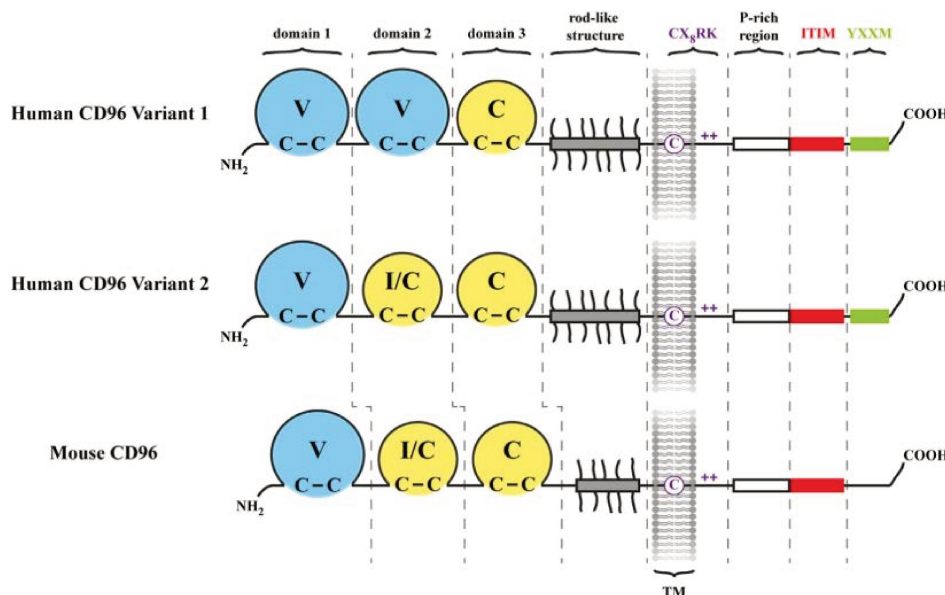
From Robert J Johnston, Xin Yu, and Jane L Grogan, *The checkpoint inhibitor TIGIT limits antitumor and antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses* *Onc Immunology* 2015

L'expression de TIGIT inhibe le rôle costimulateur de CD226 et inhibe la sécrétion des cytokines inflammatoires IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ . Ainsi, TIGIT est donc un récepteur inhibiteur qui représente une cible majeure des futurs traitements d'immunothérapie, notamment en combinaison avec les anticorps bloquants la voie PD-1/PD-L1.

## b) CD96

### (1) Structure, profil d'expression et voie de signalisation

CD96 (Tactile, T cell-activated increased late expression) est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des immunoglobulines



**Figure 39 :** Représentations schématiques des différentes formes de CD96 chez l'Homme et chez la souris

From Hristo Georgiev et al, *Coming of Age: CD96 Emerges as Modulator of Immune Responses*, *Frontiers in Immunology* 2018

principalement exprimée par les cellules hématopoïétiques, aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Chez l'Homme, CD96 est exprimé par les cellules NK ainsi que par lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Chez la souris, CD96 est également exprimé par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et par les cellules NKT (Christopher J. Chan et al., 2014; Fuchs, Cella, Giurisato, Andrey, & Colonna, 2004; Noa Stanietzky et al., 2013). CD96 possède trois domaines extracellulaires, dont le premier (Ig-V) est relativement identique à celui de CD226 et TIGIT. Ce domaine lui permet donc d'interagir principalement avec CD155, avec une affinité intermédiaire entre celles des liaisons TIGIT/CD155 et CD226/CD155 (Yu et al., 2009). Les caractéristiques structurales entre les formes humaine (hCD96) et murine (mCD96) diffèrent au niveau du nombre et de la structure des domaines extracellulaires ainsi qu'au niveau du motif cytoplasmique YXXM, ce qui tend à suggérer que CD96 possède des fonctions divergentes entre l'Homme et la souris (*Figure 39*). Aussi, il a été indiqué que chez la souris, CD96 interagit avec la nectine-1 (CD111) (S Seth et al., 2007).

Malgré le peu d'informations concernant les caractéristiques de l'interaction de CD96 avec CD155 et les modifications intracellulaires qu'elle peut engendrer, la structure de CD96 très similaire à celle de CD226 et de TIGIT laisse supposer que CD96 forme des *cis*-dimères. Chez l'Homme, la présence du motif YXXM dans le domaine cytoplasmique hCD96 indique que CD96 pourrait interagir avec une sous-unité de la PI3K et la protéine adaptatrice Grb2, importantes dans la transduction de signaux activateurs. De façon similaire à CD28 et CD226, l'engagement de CD96 semble donc induire une cascade de signalisation conduisant à activer de nombreux facteurs protéiques impliqués dans la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes. Cependant, la proximité du domaine YXXM avec le domaine inhibiteur ITIM soulève de nombreuses questions quant aux fonctions de CD96 chez l'Homme. Chez la souris, la seule présence du motif ITIM semble indiquer que CD96 régule négativement les fonctions effectrices des lymphocytes T.

## (2) Rôles de CD96

### Rôle sur les fonctions des cellules NK



Chez l'Homme, CD96 interagit avec CD155 pour costimuler les fonctions effectrices des cellules NK qui dépendent également de l'activité d'autres récepteurs activateurs engagés à leur surface, notamment les récepteurs 2B4 et NKp30 (Fuchs et al., 2004; N. Stanietsky et al., 2009). Chez la souris, CD96 inhibe la production d'IFN- $\gamma$  à la suite de son interaction avec CD155 exprimé par les cellules cibles (Christopher J. Chan et al., 2014), mais ne semble pas réguler leurs fonctions cytolytiques. Ainsi, plusieurs modèles murins de tumeurs solides (mélanome B16F10, cancer de la prostate RM-1 et carcinome pulmonaire 3LL) ont indiqué que CD96 rentre en compétition avec CD226 pour interagir avec CD155 exprimé par les cellules tumorales afin de diminuer les fonctions effectrices des cellules NK (Blake et al., 2016; Christopher J. Chan et al., 2014). Bien qu'il ait été indiqué que CD96 peut inhiber la sécrétion d'IFN- $\gamma$  indépendamment de CD226 (Christopher J. Chan et al., 2014), les effets antitumoraux résultant de l'absence (souris CD96<sup>-/-</sup>) (Christopher J. Chan et al., 2014) ou du blocage de CD96 sont réduits chez des souris CD226<sup>-/-</sup> (Roman et al., 2018). Dans les modèles murins de mélanome métastatique ( B16F10) et de fibrosarcome induit par le MCA, l'effet protecteur de l'absence de CD96 contre la croissance tumorale est abrogé par l'absence de CD226 (Christopher J. Chan et al., 2014).

Bien que l'interaction entre CD155 et CD96 diminue les fonctions effectrices des cellules NK, la reconnaissance entre CD155 et CD226 joue un rôle prédominant dans le contrôle du développement de la tumeur (Christopher J. Chan et al., 2014). Au vu du rôle de TIGIT et de PD-1 dans la régulation négative des fonctions des cellules NK, le modèle préclinique de mélanome B16F10 a permis de mettre en évidence que le blocage combiné de TIGIT/CD96 ou TIGIT/PD-1 limite la formation de tumeurs et leur capacité à métastaser en périphérie, respectivement (Blake et al., 2016). Aussi, le traitement anti-CD96 améliore la survie de souris porteuses de tumeur mammaire traitées avec un agent chimiothérapeutique (Blake et al., 2016) et empêche les rechutes de cancers réfractaires aux immunothérapies actuelles (Brooks et al., 2018). Ces travaux suggèrent donc fortement que CD96 représente une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement du cancer.

Chez l'Homme, malgré le manque d'informations concernant le rôle de CD96, il semblerait que le motif YXXM soit à l'origine du rôle activateur de CD96 dans les fonctions antitumorales des cellules NK. Une étude clinique réalisée sur des patients atteints du cancer du pancréas a révélé

récemment que la diminution de la fréquence des cellules NK coexprimant CD226 et CD96 est positivement corrélée à la progression de la maladie (Peng et al., 2016).

### Rôle sur les fonctions des lymphocytes T

CD96 est exprimé à la surface des cellules T périphériques dont l'expression est rapidement augmentée en réponse à la stimulation du TCR (P. L. Wang, O'Farrell, Clayberger, & Krensky, 1992). Contrairement à CD226 et TIGIT, le rôle de CD96 dans les fonctions effectrices des lymphocytes T et notamment au cours de la réponse immunitaire antitumorale, reste actuellement peu caractérisé. Dans les infections chroniques chez l'Homme, le rôle de CD96 dans les fonctions des LT CD8<sup>+</sup> a été investigué chez des patients atteints du virus du SIDA (HIV) et d'hépatite B (Eriksson et al., 2012; Gong et al., 2009). Les études réalisées sur les patients atteints d'hépatite B ont révélé qu'il existe dans le sérum des patients une concentration plus élevée d'une forme soluble de CD96 par rapport aux individus sains (Gong et al., 2009), pouvant ainsi suggérer qu'il existe une corrélation entre l'expression de CD96 et la progression de la maladie.

Par la suite, des travaux ont révélé que malgré des fonctions effectrices identiques entre les populations LT CD8<sup>+</sup> CD96<sup>-</sup> et LT CD8<sup>+</sup> CD96<sup>+</sup> (initialement identifiées chez des individus sains), la diminution de la fréquence des LT CD8<sup>+</sup> CD96<sup>+</sup> et du niveau de d'expression de CD96 à leur surface est positivement corrélée à l'évolution de la maladie chez des individus infectés par le VIH (Eriksson et al., 2012). Ces deux études suggèrent que la diminution de la forme membranaire de CD96 est corrélée à l'augmentation de la forme soluble de CD96 dans le sang de patients atteints d'infections virales chroniques. Bien qu'il soit supposé que de façon identique aux cellules NK, CD96 est un récepteur activateur des fonctions des LT CD8<sup>+</sup> chez l'Homme, des études complémentaires sont nécessaires à une meilleure compréhension du rôle de CD96 dans les infections chroniques et notamment dans le cancer.

## II. RESULTATS

### **Article – soumis le 24 septembre 2019 à Immunity**

#### **Eomes-dependent CD226 loss alters TCR responsiveness and restrains CD8+ T lymphocyte anti-tumor functions**

Marianne Weulersse<sup>1,8</sup>, Assia Asrir<sup>1,8</sup>, Andrea C Pichler<sup>1,8</sup>, Matthias Braun<sup>2</sup>, Marie-Véronique Joubert<sup>1,3</sup>, Laura Do Souto<sup>1,3</sup>, Guillaume Gaud<sup>4</sup>, Indrajit Das<sup>2</sup>, Clara M. Scarlata<sup>1</sup>, Ashmitha Sundarrajan<sup>5</sup>, Nadège Carrié<sup>1</sup>, Sahar Kassem<sup>1</sup>, Marine Cuisinier<sup>1,3</sup>, Laure Buisson<sup>1,3</sup>, Sabrina Maheo<sup>1,3</sup>, Michaël Pérès<sup>1,3</sup>, Els Verhoeven<sup>6,7</sup>, Alejandra Martinez<sup>1,3</sup>, Camille Guillerey<sup>2</sup>, Arantxa Agesta<sup>4</sup>, Abdelhadi Saoudi<sup>4</sup>, Maha Ayyoub<sup>1,3</sup>, Anne Dejean<sup>4</sup>, Hervé Avet-Loiseau<sup>1,3</sup>, Tobias Bald<sup>2,5</sup>, Mark J. Smyth<sup>2</sup> and Ludovic Martinet<sup>1,3\*</sup>.

<sup>1</sup>Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 1037, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France. <sup>2</sup>Immunology in Cancer and Infection Laboratory, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Queensland, Australia. <sup>3</sup>Institut Universitaire du Cancer, CHU Toulouse, Toulouse France. <sup>4</sup>Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 1043, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5282, Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France. <sup>5</sup>Oncology and Cellular Immunology Laboratory, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Queensland, Australia. <sup>6</sup>Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France. <sup>7</sup>CIRI, Université de Lyon, INSERM U1111, ENS de Lyon, CNRS UMR 5308, Lyon, France

<sup>8</sup>These authors contributed equally

\* Lead contact

#### **Full correspondence**

**Lead contact:** Dr Ludovic Martinet, INSERM UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse, 2 av Hubert Curien, 31037 Toulouse, France. E-mail address: [ludovic.martinet@inserm.fr](mailto:ludovic.martinet@inserm.fr); Phone: +33-5-8274-1757

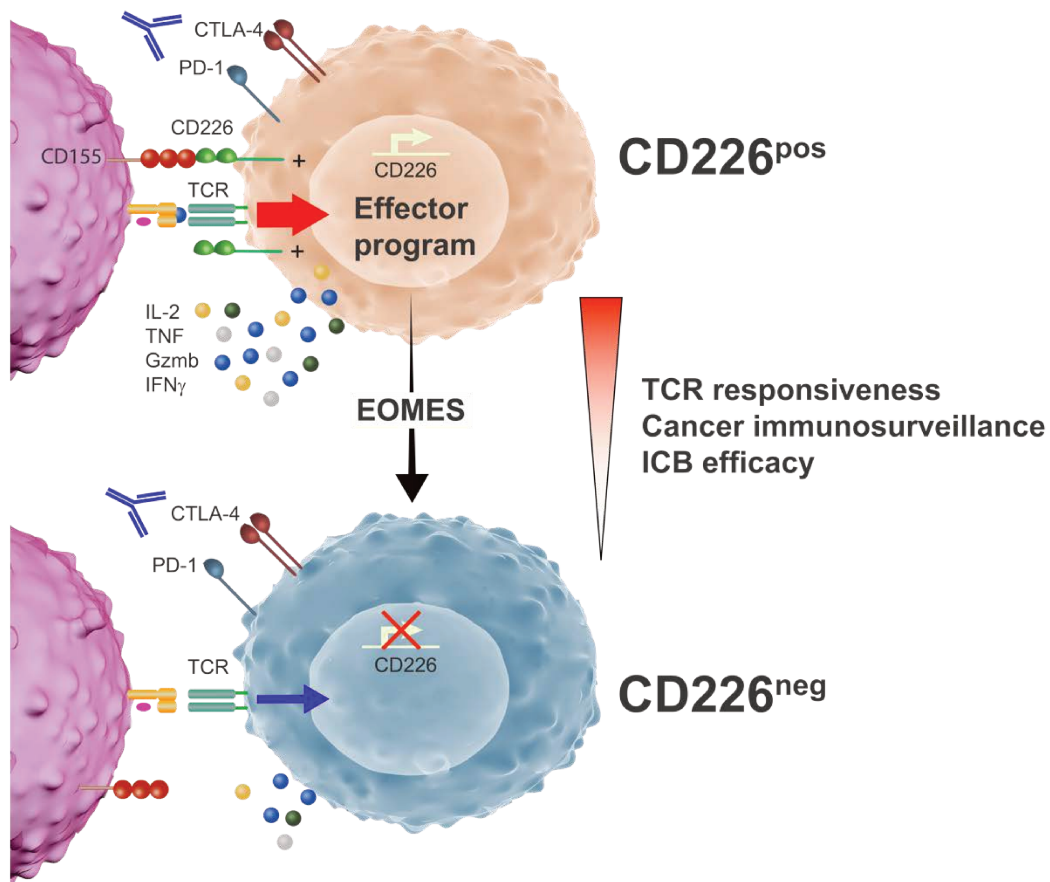
**8 Figures, 8 Supplementary Figures, 88 References.**

**Key words:** CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, TCR signaling, Co-stimulation, CD226 (DNAM-1), tumor immune escape, T cell exhaustion, Immunotherapy, immune checkpoint blockade.

## IN BRIEF

Through complementary approaches, involving cancer patients' samples and relevant mouse tumor models, this study reveals that the Eomes-dependent loss of the activating receptor CD226 (DNAM-1) represents a critical determinant of tumor infiltrating CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction potentially affecting immune checkpoint blockade efficacy.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## HIGHLIGHTS

- The absence of CD226 impedes TCR signaling and effector program of CD8<sup>+</sup> T cells.
- Dysfunctional CD226-negative CD8<sup>+</sup> T cells accumulate in tumors.
- Tumor-induced CD226-loss depends on Eomes transcription factor.
- CD226 loss limits CD8<sup>+</sup> T cell response to Immune checkpoint blockade.

## **ABSTRACT**

Although anti-PD-1 and anti-CTLA-4 based immune checkpoint blockade (ICB) has represented a turning point in cancer care, clinical responses are observed only in a fraction of cancer patients. Most research focuses on the identification of additional inhibitory receptors restraining the anti-tumor functions of CD8<sup>+</sup> T cells. By contrast, herein, we found that loss of the activating receptor CD226 (DNAM-1) was a critical mechanism affecting CD8<sup>+</sup> T cell responsiveness to TCR stimulation. Using cancer patients' samples and preclinical mouse models, we discovered that dysfunctional CD226-negative CD8<sup>+</sup> T cells progressively accumulated in the tumor microenvironment through a mechanism involving the T-box transcription factor Eomesodermin (EOMES). More importantly, we demonstrated that CD226-negative tumor infiltrating lymphocytes had reduced anti-tumor functions and failed to respond to ICB. Altogether, our results revealed that CD226 loss is a critical immune escape mechanism restraining CD8<sup>+</sup> T cell function and potentially affecting the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy.

## INTRODUCTION

CD8<sup>+</sup> T lymphocytes play a critical role in limiting tumor progression and represent the most promising therapeutic host immune target against cancer (Schumacher and Schreiber, 2015). CD8<sup>+</sup> T cell activation is mainly triggered by TCR recognition of MHC-I-peptide complexes but additional signals provided through a wide array of stimulatory and inhibitory molecules critically influence CD8<sup>+</sup> T cell anti-tumor functions (Chen and Flies, 2013). In the past decade, an extensive number of studies demonstrated the key role played by inhibitory receptors such as PD-1 (CD279) and CTLA-4 (CD152) in driving a state of CD8<sup>+</sup> T cell hypo-responsiveness called T cell exhaustion, frequently observed in chronic viral infections and cancer (Wherry and Kurachi, 2015). Some previous striking clinical results achieved with monoclonal antibodies (mAbs) blocking these receptors in metastatic melanoma illustrated the therapeutic promise of targeting inhibitory receptors to restore cytotoxic lymphocyte anti-tumor reactivity (Robert et al., 2011; Topalian et al., 2012). Still, clinical responses are observed only in a fraction of cancer patients treated with ICB. While most of the experimental strategies actually focus on the identification of additional inhibitory receptors restraining anti-tumor reactivity of CD8<sup>+</sup> T cells, the importance of activating receptors with regards to anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cell functions and ICB efficacy remains to be better understood.

CD226 (DNAM-1, PTA-1, TLISA1) is an adhesion molecule initially described for its ability to stimulate NK cell- and CD8<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxicity (Martinet and Smyth, 2015a; Shibuya et al., 1996). Its ligands, the nectin and nectin-like receptors CD112 and CD155, are often expressed on cancer cells as a consequence of cellular stress (Chan et al., 2014b) and CD226 deficiency was shown to reduce tumor immunosurveillance in a wide number of solid and lymphoid tumor mouse models (Chan et al., 2014a; Gilfillan et al., 2008; Guillerey et al., 2015; Iguchi-Manaka et al., 2008; Tahara-Hanaoka et al., 2006). TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) and CD96, two inhibitory receptors that compete with CD226 for the same ligands, were recently identified as promising immunotherapeutic targets to restore immune reactivity against tumors (Blake et al., 2016a; Blake et al., 2016b; Chan et al., 2014a; Guillerey et al., 2018; Kurtulus et al., 2015) highlighting the importance of the CD226 axis in the regulation of anti-tumor immune responses. The CD226 pathway may also represent an important determinant of ICB efficacy as evidenced by a recent study demonstrating that the PD-1/PD-L1 pathway is a negative regulator of CD226 signaling and that PD-1 and GTR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein) dual blockade fail to promote mouse tumor regression in the absence of CD226 (Wang et al., 2018).

Despite the critical role of CD226 in the T cell-dependent control of malignancies, the underlying mechanisms remain to be further addressed. Indeed, besides the ability of CD226 to regulate target cell adhesion and killing, there is now accumulating evidence indicating that this molecule may influence additional aspects of T cell biology such as terminal maturation of CD8<sup>+</sup> thymocytes (Danisch et al., 2013; Qiu et al., 2010), T helper cell differentiation (Gaud et al., 2018; Lozano et al., 2012; Lozano et al., 2013; Shibuya et al., 2003) and Treg suppressive functions (Koyama et al., 2013). In addition, although recent evidence suggests that CD226 contains an intracellular signaling domain that closely resembles CD28 (Zhang et al., 2015), the importance of this molecule in TCR activation remains poorly understood to date. In this study, we demonstrate using complementary set of experiments involving human samples and mouse tumor models that the absence of CD226 identifies a subset of CD8<sup>+</sup> T cells with severely impaired functions that accumulates in the tumor microenvironment through an Eomes-dependent mechanism. More importantly, we found that CD226-negative tumor infiltrating lymphocytes have altered TCR signaling, reduced anti-tumor functions and fail to respond to anti-PD-1 immunotherapy. Altogether, our results reveal a yet unappreciated mechanism restraining CD8<sup>+</sup> T cell functions and ICB efficacy initiated by the loss of the activating receptor CD226.

## RESULTS

### The absence of CD226 expression identifies hypo-reactive human CD8<sup>+</sup> T cells.

Despite the importance of the CD226 pathway in cancer immunosurveillance and its emerging role in autoimmune disorders and infections (Martinet and Smyth, 2015a), little information was available regarding the expression of this receptor on human CD8<sup>+</sup> T cells. Interestingly, we observed in the peripheral blood of healthy donors (HD) the presence of two distinct CD8<sup>+</sup> T cell populations based on CD226 expression (**Figure 1A**). CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell populations expressed comparable levels of most classical CD8<sup>+</sup> T cell markers (**Figure S1A**) and had similar TCR V beta repertoires (**Figure 1B**). These subsets were also similarly present across the different CD8<sup>+</sup> T cell maturation stages including naïve (Tn, CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>); central memory (Tcm, CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>); effector memory (Tem, CD62L<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>); terminal effector memory (Temra, CD62L<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) (**Figure 1C**) and their frequency was independent of the age and gender of the different donors analyzed (**Figure S1B**). The contrasting expression of CD226 on CD8<sup>+</sup> T cells with identical phenotype and maturation questioned about the potential functions of these two subsets. To exclude any analytic bias inherent to mixed CD8<sup>+</sup> T maturation stages, we first separated CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tn, Tcm and Tem subsets by flow cytometry. Analysis of TCR-induced proliferation using anti-CD2/CD3/CD28 microbeads revealed that CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells had strikingly lower proliferation capacities than CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells regardless of the differentiation stage (**Figure 1D**). Lower CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell proliferation was confirmed in unsorted CD8<sup>+</sup> T cell cultures stimulated with allogeneic monocyte-derived dendritic cells or CMVpp65 peptide pools (**Figure 1E**). CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tems also produced a considerably lower amount of IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, CCL5, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  than CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> Tems upon TCR stimulation (**Figure 1F and Figure S1C**). Similar results were obtained when we assessed the intracellular production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and CD107a degranulation marker by CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells after 6 hrs of stimulation in the presence of Fc $\gamma$ R<sup>+</sup> P815 cell line coated with increasing concentrations of anti-CD3 mAbs (**Figure 1G and Figure S1D**). By contrast, CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells had comparable cytokine production upon stimulation with PMA/ionomycin (**Figure S1E-F**) suggesting that both CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells have similar intrinsic functional capacities. Altogether, these results demonstrate that CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> T cells display functional signs of hypo-responsiveness including defective proliferation, cytokine secretion and degranulation in response to TCR stimulation.

These data suggested that CD8<sup>+</sup> T cells lacking CD226 may have an altered TCR signaling. To confirm this hypothesis, we first monitored the influx of intracellular Ca<sup>2+</sup> in CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, a key event in TCR signaling cascade. We observed that Ca<sup>2+</sup> influx triggered by anti-CD3 stimulation was reduced in CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells as compared to CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure 1H**).





In concert, we found that proteins implicated in proximal TCR signaling such as SLP76, ZAP70 and LAT were less phosphorylated in purified CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells as compared to CD226<sup>+</sup> cells upon CD3 stimulation (**Figure 1I-J** and **Figure S1G**). Lower phosphorylation of key TCR downstream signaling proteins, such as mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and the PI3K target Akt, was also observed after anti-CD3 stimulation in sorted CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells as compared to CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure 1K**). Altogether, these results establish that the absence of CD226 in healthy individuals identifies a subset of CD8<sup>+</sup> T cells with reduced TCR signaling.

### **The absence of CD226 alters the TCR-induced CD8<sup>+</sup> T cell transcriptional program.**

To better understand the molecular differences between CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, we performed a global transcriptional analysis of purified CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells before and after TCR activation using next generation RNA sequencing. To our surprise, resting CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells displayed relatively similar gene expression profiles with only 76 genes differentially expressed (*fold change* >2; *Adjp* <0.01) (**Figure 2A-D**). Of note, *CD226* was the most differentially expressed gene between CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (*fold change* = 55 *Adjp* = 4.5x10<sup>-50</sup>) (**Figure 2C**). Similar results were obtained comparing transcriptomic profiles of resting T<sub>n</sub>, T<sub>cm</sub> and T<sub>emra</sub> CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subsets (**Figure S2A-B**) thus indicating that CD226 absence on CD8<sup>+</sup> T cells was not only due to ligand-induced protein internalization as shown by *Braun et al.* (Braun et al.), but rather resulted from transcriptional regulation of this gene. Although functional analysis suggested that CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were hypo-responsive to TCR stimulation, our global transcriptional analysis revealed that both CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells displayed signs of activation upon anti-CD2/CD3/CD28 stimulation with respectively 5850 and 6577 genes differentially expressed between the resting and activation states (*fold change* > 2 ; *Adjp* <0.01) (**Figure 2A-B**). Still, non-hierarchical clustering and principal component analysis (PCA) also revealed critical differences between anti-CD2/CD3/CD28 activated CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells with 1209 up-regulated and 880 down-regulated genes (*fold change* > 2 ; *Adjp* <0.01) between both subsets (**Figure 2 A-D**). In line with our previous findings (**Figure 1**), GSEA and Go term analysis confirmed that activated CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell specific genes were enriched in gene signatures related to cell cycle, protein synthesis, TCR activation, T<sub>H1</sub> differentiation and IL-2/IL-15 signaling (**Figure 2E-F** and **Figure S2C**). Conversely, activated CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell specific genes were enriched in gene signatures related to resting T cells, regulatory T cells and TGF-β signaling (**Figure 2E-F** and **Figure S2C**) thus validating at the transcriptional level the functional advantage of CD226<sup>+</sup> over CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells upon TCR stimulation.

### **Mechanisms underlying CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell hypo-responsiveness.**

Altogether, our results suggested that the presence of CD226 receptor may be critical for TCR induced effector program of CD8<sup>+</sup> T cells. To confirm this hypothesis, we transduced purified CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells with GFP lentiviral vector encoding or not for CD226 and analyzed their effector functions in response to TCR stimulation. Previously described Baboon retroviral envelope glycoprotein (BaEV-LVs; (Girard-Gagnepain et al., 2014)) and measles virus glycoprotein-displaying LVs (H/F-LVs; (Levy et al., 2017)) that efficiently transduce resting primary human T lymphocytes were used to avoid any TCR pre-activation step (**Figure 3A and Figure S3A**). Consistent with our previous results, we found that CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells that did not express CD226 (GFP<sup>-</sup> cells), or cells transduced with a GFP control vector, had a reduced ability to produce pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and poorly expressed the CD107a degranulation marker in response to TCR stimulation as compared to CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure 3B and Figure S3A**). By contrast, CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells that ectopically expressed CD226 (GFP<sup>+</sup> cells) produced significantly higher levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and CD107a than cells that were not transduced or transduced with a GFP control vector (**Figure 3B and Figure S3A**). Altogether, these results confirm that CD226 absence greatly impairs the functional activation of CD8<sup>+</sup> T cells in response to TCR stimulation and that CD226 forced expression by lentiviral vector can restore CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell functions.

We next wanted to gain insight into the molecular mechanisms underlying CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell functional defects. Given the tight link between LFA-1 and CD226 signaling (Shibuya et al., 1999; Shibuya et al., 2003), we hypothesized that CD226 absence might directly impact LFA-1 functions. To address this hypothesis, we analyzed LFA-1 activation into its open conformation, an early event increasing T cell adhesion and lowering the threshold required for TCR signaling (Bachmann et al., 1997; Dustin and Springer, 1989). Although CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells expressed comparable steady state levels of total LFA-1 (**Figure S1A**), we found that CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells expressed significantly higher level of high affinity LFA-1 than their CD226<sup>-</sup> counterparts both in steady state conditions and upon TCR stimulation (**Figure 3C-D and Figure S3B**). To confirm the importance of LFA-1 in TCR-induced signaling, we analyzed cytokine production by CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the presence of blocking antibodies against LFA-1. Consistent with the well documented role of LFA-1 in efficient TCR signaling (Bianchi et al., 2000; Perez et al., 2003), we found that blocking LFA-1 significantly decreased the production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure 3 E**). Altogether these results suggest that alteration in LFA-1 signaling due to CD226 loss might be involved in CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction. By contrast, CD226 negative regulators CD96, TIGIT or PVRIG (CD112R) (Chan et al., 2014a; Johnston et al., 2014; Zhu et al., 2016) may not directly account for CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell hypo-responsiveness. First, CD96 or TIGIT blockade did not restore TCR-induced proliferation nor IFN- $\gamma$  secretion by CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure S3C-D**) and

PVRIG transcripts were almost undetectable on purified CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure S3E**). Second, their common ligands CD112 and CD155 were hardly detectable at the mRNA level in our assays only containing purified CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure S3E**). Finally, CD112 and CD155 *in vitro* blockade did not reduce CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell functions induced by TCR stimulation (**Figure S3C-D**). This also implies that CD226 may act independently of its ligands as suggested by pioneer studies from *Shibuya et al.* showing that CD226 was phosphorylated by TCR or LFA-1 engagement (Shibuya et al., 1999; Shibuya et al., 2003).

### **CD226 absence identifies dysfunctional human CD8<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes.**

We next addressed the importance of CD226 expression in the tumor context. We first analyzed CD226 expression on CD8<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes (TILs) isolated from a cohort of 177 patients newly diagnosed with multiple myeloma (MM; IFM 2009 (Attal et al., 2017)), a frequent yet incurable hematological malignancy affecting the bone marrow (BM) (**Figure S4A**). We found that the percentage of BM CD8<sup>+</sup> T cells lacking CD226 expression was significantly increased in MM patients as compared to healthy donors (**Figure 4A and Figure S4B-C**). CD226<sup>-</sup> percentages were also significantly higher among CD8<sup>+</sup> TILs than PBMCs in MM patients (**Figure 4B**). Notably, the percentage of CD226 expressing CD8<sup>+</sup> T cells significantly correlated with myeloma CD8<sup>+</sup> T cell infiltration (**Figure S4D**) and *CD226* gene expression was strongly associated with the expression of cytotoxic lymphocyte functional genes including *CD2*, *CD3E*, *CD3D*, *TBX21*, *CD8B*, *PRF1*, *GZMA*, and *GZMB* in MM patient's samples (**Figure S4E**). These data suggested a relationship between CD226 loss and CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction in the tumor microenvironment. Functional analysis of myeloma infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells upon *in vitro* re-stimulation with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads confirmed that CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells had significantly lower TCR-induced proliferation, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production and degranulation than CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure 4C-D and Figure S4F-G**). Of note, CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> populations were also present among NY-ESO-1 tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure S4H**) and the absence of CD226 expression was again associated with reduced cytokine production by CD8<sup>+</sup> T cells upon stimulation with NY-ESO-1 peptide (**Figure 4E-F**). Interestingly, CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells with reduced effector functions also represented a significant fraction of TILs isolated from other cancer types including breast and ovarian carcinomas (**Figure 4G-H**). In invasive breast Cancer (BRCA) cohorts from the TCGA data base, CD226 expression was also associated with significantly decreased disease-free (DFS) and overall survival (OS) (**Figure 4I and Figure S4I**). Altogether, these results demonstrate that the absence of CD226 expression, (1) identifies TILs with severely impaired functions across diverse malignancies, (2) could impact patient clinical outcome.

### **Tumor microenvironment drives the differentiation of dysfunctional CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells.**

To understand the link between tumor progression, CD226 loss and CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction, we explored CD226 expression in well characterized preclinical mouse cancer models. As described previously (Seth et al., 2011), we found that most CD8<sup>+</sup> T cells isolated from the spleen C57BL/6 WT mice expressed homogeneous levels of CD226. By contrast, we observed the progressive emergence of a CD226 negative population among CD8<sup>+</sup> T cells infiltrating B16F10 melanoma and VK12653 myeloma tumors (**Figure 5A-C and Figure S5A-C**). In both models, the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TILs significantly correlated with tumor size (**Figure S5D-E**) suggesting a link between CD226 loss and tumor development. As in humans, CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells accumulating in mouse tumor microenvironment were characterized by significantly decreased proliferation as evidenced by reduced Ki67 staining (**Figure 5D**). Upon *in vitro* re-stimulation with anti-CD3/anti-CD28 mAbs, they also produced significantly less IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  than their CD226<sup>+</sup> counterparts (**Figure 5E**). These results confirm that the absence of CD226 in CD8<sup>+</sup> T cells marks a dysfunctional population associated with tumor progression. We next wanted to determine whether tumor antigen specific CD226<sup>+</sup> T cells could differentiate into CD226<sup>-</sup> T cells during the course of tumor development. To address this question, we transferred naïve CD226<sup>+</sup> ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells isolated from the spleen of OT-1 mice into immunodeficient *Rag2<sup>-/-</sup>gc<sup>-/-</sup>* mice bearing B16F10 expressing or not ova antigen (**Figure 5F**). Seven days after OT-1 transfer, we detected an accumulation of OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells with a low CD226 expression within B16F10-ova tumors (**Figure 5G-H and Figure S5F**). OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells were also present in B16F10 tumors, although at lower frequencies (**Figure S5F**). Yet, in the absence of their cognate antigen, most of the B16F10 intratumor OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells retained a high CD226 expression (**Figure 5G-H**). Of note, CD226<sup>-</sup>OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells were also almost undetectable in the spleen of B16F10 and B16F10-ova bearing mice (**Figure 5G-H**). Finally, intratumor CD226<sup>-</sup>OT-1 T cell accumulation was also observed after CD226<sup>+</sup> OT-1 T cells adoptive transfer into B16F10-ova bearing *Cd8a<sup>-/-</sup>* mice (**Figure S5G**). Taken together these results demonstrate that tumor microenvironment can drive the differentiation of CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells into CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in a tumor-antigen dependent manner.

### **Immune checkpoint blockade efficacy relies on CD226.**

Although CD226 loss associated defects were evocative of exhausted T cell (Tex) dysfunction (Thommen and Schumacher, 2018; Wherry, 2011), both CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs isolated from B16F10 bearing mice had a phenotype consistent with Tex cells characterized by a high expression of PD-1, LAG-3 and CTLA-4 (**Figure 6A, B**). Similar levels of PD-1, Tim-3 and TIGIT were also observed on CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> TILs isolated from breast and ovarian cancer patients (**Figure 6C and Figure S6A**). Therefore, we thought that CD226 expression might impact CD8<sup>+</sup> T cell response to immune checkpoint blockade.

To address this hypothesis, we analyzed CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tem cell responsiveness to anti-PD-1 blockade using a B16K1 melanoma variant overexpressing MHC-I. As shown previously (Bertrand et al., 2017), anti-PD-1 mAb injection led to a significant decrease in tumor growth as compared to control Ig treatment in this model (**Figure 6D**). A concomitant increase in the percentage of tumor infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells and proliferating Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs was also observed (**Figure S6B**). Still, while anti-PD-1 increased the *in vivo* proliferation of CD226<sup>+</sup> TILs, the proliferation of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TILs was not significantly affected by this treatment (**Figure 6E**). In addition, unlike their CD226<sup>+</sup> counterparts, anti-PD-1 treatment failed to increase *ex vivo* IFN- $\gamma$  production by CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TILs (**Figure 6F**). Altogether, these results indicate that anti-PD-1 treatment mostly reinvigorates CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells suggesting that CD226 expression may be critical for anti-PD-1 efficacy. To confirm this hypothesis, WT or *Cd226*<sup>-/-</sup> mice bearing MC38 tumors were treated with anti-PD-1 or control Ig antibodies. We found that PD-1 blockade resulted in significant reduction in tumor growth in WT mice while it only had minor effects in *Cd226*<sup>-/-</sup> mice (**Figure 6G**). Tumor-bearing WT mice injected with anti-CD226 blocking mAbs also failed to respond to anti-PD-1 treatment (**Figure 6G**). Finally, similar results were obtained when tumor-bearing mice were treated with PD-1 alone or in combination with anti-CTLA-4, thus confirming the importance of CD226 in the efficacy of ICB (**Figure S6C**). Altogether, these results suggest that the accumulation of defective CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TILs may represent an important parameter limiting the efficacy of ICB.

#### **Tumor-induced CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells accumulation depends on Eomes expression.**

Although RNAseq analysis revealed that human resting CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells have similar transcriptional programs, we found that several markers and transcription factors (TF) differed between these two subpopulations (**Figure S2C**). In particular, we found that Eomesodermin (Eomes) mRNA was expressed significantly higher in the CD226<sup>-</sup> fraction of both resting and activated human CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure 7A**). Similar observations were made at the protein level in CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HD or cancer patient's samples (**Figure 7B**). Together with previous evidence showing that high Eomes expression limits TILs responsiveness to ICB (Blackburn et al., 2008; Paley et al., 2012), these results questioned the role of this TF in the accumulation of dysfunctional CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in tumors. To address this point, we analyzed the tumor-induced differentiation of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in *CD4*<sup>cre</sup>*xEomes*<sup>fl/fl</sup> mice (*Eomes*<sup>KO</sup>) that have T cell specific deletion of *Eomes*. First, we confirmed that CD226<sup>-</sup> TILs expressed significantly higher levels of Eomes in both B16F10 (**Figure 7C-D and Figure S7A-C**) and Vk12653 (**Figure S7D-G**) bearing *CD4*<sup>WT</sup>*xEomes*<sup>fl/fl</sup> control mice (*Eomes*<sup>WT</sup>). More importantly, in both tumor models, the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TILs was strongly reduced in *Eomes*<sup>KO</sup> mice as compared to *Eomes*<sup>WT</sup> mice (**Figure 7C,E and Figure S7G**).

Of note, the absence of Eomes did not significantly affect tumor size, nor tumor CD8<sup>+</sup> Tem percentage ruling out a potential impact of these parameters in the observed differences between *Eomes*<sup>KO</sup> and *Eomes*<sup>WT</sup> mice (**Figure S7A-F**). Still, to confirm the role of Eomes in CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell development, we treated WT mice with agonist antibodies against CD137 (TNFRSF9, 4-1BB) as this treatment was recently shown to induce a strong Eomes up-regulation in T cells (Curran et al., 2013). As expected, anti-CD137 treatment resulted in the expansion of CD8<sup>+</sup> T cells with an effector memory phenotype that expressed high levels of Eomes in the different lymphoid organs tested (**Figure 7F-G and Figure S8A**). Remarkably, anti-CD137-induced Eomes over-expression was accompanied by the progressive emergence of CD8<sup>+</sup> Tems lacking CD226 expression in a dose dependent manner (**Figure 7F-G and Figure S8B-C**). By contrast, agonist mAbs targeting other immunostimulatory members of the TNF receptor family such as GITR or OX40 did not increase Eomes expression nor the frequency of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure S8D-E**). Once again, we found that Eomes was more expressed by CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure 7H**) and Eomes deficiency significantly abrogated CD226 loss induced by anti-CD137 mAb treatment thus confirming the importance of this TF in the program leading to CD226 loss (**Figure 7I-J**). importantly, anti-CD137 also induced CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell accumulation in CD155<sup>-/-</sup> mice, ruling out any critical role of CD226/CD155 interactions in the emergence of CD8<sup>+</sup> T cells lacking CD226 expression upon CD137 stimulation (**Figure 7K**). To confirm whether anti-CD137 agonists promoted the differentiation of CD226<sup>+</sup> T cells into CD226<sup>-</sup> T cells as shown in the tumor context, we transferred purified CD226<sup>+</sup> naïve CD8<sup>+</sup> T cells into *Rag2<sup>-/-</sup>gc<sup>-/-</sup>* mice (**Figure 7L**). A few days after cell transfer, most CD8<sup>+</sup> T cells had undergone several rounds of division as a result of homeostatic expansion. They had also acquired a CD44<sup>hi</sup> memory T cell phenotype but remained CD226<sup>+</sup> T cells, ruling out that the emergence of CD226<sup>-</sup> cells only resulted from CD8<sup>+</sup> T cell division or memory T cell differentiation (**Figure S8F**). By contrast, the subsequent injection of anti-CD137 mAbs promoted the accumulation of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tems confirming that the accumulation of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells upon CD137 activation resulted from the CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell differentiation (**Figure 7M**). Altogether, this demonstrates that Eomes over-expression induced by tumor antigens or CD137 receptor stimulation drives the differentiation of CD226<sup>+</sup> into CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells.

### **CD226 loss restrains CD8<sup>+</sup> T cells antitumor functions *in vivo*.**

Finally, we verified that CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells that emerged during anti-CD137 treatment displayed comparable functions with tumor infiltrating CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. We found that purified CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tems from anti-CD137-treated mice divided less and produced lower levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  than their CD226<sup>+</sup> counterparts in response to anti-CD3/anti-CD28 stimulation (**Figure 8A-B**). Using OT-1 mice treated with anti-CD137 (**Figure S8G**), we confirmed that antigen specific CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells have lower effector functions than their CD226<sup>+</sup> counterparts in response to ova stimulation (**Figure 8C**).

Interestingly, CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tems isolated from anti-CD137-treated mice had strongly reduced CD226 mRNA levels as compared to CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems confirming, as in humans, that CD226 loss process occurs at the transcriptional level (**Figure S8H**). To gain clear insight into the anti-tumor functions of CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, we transferred tumor-specific CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells into tumor bearing mice. We used *Pmel-1* transgenic mice that all harbor CD8<sup>+</sup> T cells specific for the B16 gp100 melanoma antigen. *Pmel-1* mice were treated with anti-CD137 and sorted CD226<sup>-</sup> or CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems were transferred into B16F10 melanoma bearing mice according to previously described adoptive cell transfer (ACT) protocol (Landsberg et al., 2012)(**Figure 8D**). Consistent with their reduced effector capabilities *in vitro*, CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells only mildly reduced tumor development while the transfer of CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells resulted in a drastic reduction in tumor growth and significantly prolonged survival of mice (**Figure 8E-F**). In summary, these results confirm that the absence of CD226 is key receptor that allows the identification of dysfunctional CD8<sup>+</sup> T cells among tumor infiltrating lymphocytes in mice and humans.



## DISCUSSION

The mechanisms underlying the lack of responsiveness of anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cells are still poorly understood and finding additional signals that regulate their functions has become a major priority. In the present study, we found that loss of the activating receptor CD226 is a critical mechanism that alters CD8<sup>+</sup> T cell responsiveness to TCR stimulation. Pre-clinical tumor mouse model confirmed that tumor development drives the accumulation of dysfunctional CD8<sup>+</sup> T cell lacking CD226 expression through an Eomes-dependent mechanism. More importantly, our results demonstrated that CD8<sup>+</sup> T cells fail to respond to ICB in the absence of CD226. Taken together our study suggests that CD226 loss represents an underappreciated determinant of CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction in the tumor microenvironment that may impact cancer patient response to immunotherapy.

The profound cancer-immunosurveillance defects depicted by our group and others in diverse tumor mouse models (Gilfillan et al., 2008; Guillerey et al., 2015; Iguchi-Manaka et al., 2008) in the absence of CD226 suggested this receptor might exert central functions in T lymphocyte biology. The implication of this receptor in CD4<sup>+</sup> T helper cell differentiation (Gaud et al., 2018; Lozano et al., 2012; Lozano et al., 2013) and the association between *CD226* gene single nucleotide polymorphism (SNP) with increased development of autoimmune pathologies (Maiti et al., 2010; Song et al., 2012; Todd et al., 2007) supported this hypothesis. Yet, initial studies using CD226-deficient mice indicated that CD226 is not formally required for antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell activation and no striking immune defects were found in the absence of CD226 (Gilfillan et al., 2008). Based on this evidence, this receptor was so far mainly considered as a co-stimulatory receptor increasing cytotoxic T lymphocyte- and NK cell-mediated cytotoxicity against CD112- and CD155-expressing targets. Herein, using diverse TCR triggering agents, in the presence or absence of CD28 co-stimulation, we presented compelling evidence that CD8<sup>+</sup> T cells that do not express CD226 are hypo-responsive to TCR stimulation and have limited effector functions. These results imply that CD226 plays a more central role than originally thought in CD8<sup>+</sup> T cell activation program induced by TCR engagement.

The phenotype of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD226 or not were very similar for the different healthy donors and cancer patients analyzed in our study. These results were confirmed by RNAseq analysis of freshly purified peripheral blood CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells with only 76 genes differentially expressed between both subsets. It is unlikely that these subtle differences at the resting state may be responsible for the divergent functional outcomes observed between CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells upon TCR stimulation since we found that CD226 forced expression through lentiviral vectors restored CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells functions in response to TCR stimulation.

These results together with the reduced phosphorylation of several key TCR downstream signaling molecules observed upon anti-CD3 stimulation in the absence of CD226 strongly argue for a key role of CD226 in CD8<sup>+</sup> T cell TCR signaling. Although CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells both underwent important transcriptional modifications upon anti-CD2/CD3/CD28 stimulation, archetypal effector T cell-associated genes were only detected in stimulated CD226<sup>+</sup> T cells. Such results suggest that the presence of CD226 directly impacts TCR induced CD8<sup>+</sup> T cell effector program. Understanding how CD226 modulate TCR signaling in CD8<sup>+</sup> T cells may provide new approaches to restore T cells functions especially in tumor context.

Several pieces of evidence indicate that CD226 is implicated in LFA-1 functions (Shibuya et al., 1999; Shirakawa et al., 2005; Shirakawa et al., 2006). LFA-1 binding to ICAM-1 on contacting cells represents a critical early event driving actin-cytoskeleton reorganization, immune synapse formation, and co-stimulation ultimately lowering TCR activation threshold (Bachmann et al., 1997; Bianchi et al., 2000; Perez et al., 2003). Interestingly, we found that TCR induced “inside-out” signal, driving LFA-1 activation into its high-affinity conformation (Dustin and Springer, 1989), is greatly reduced in the absence of CD226 in CD8<sup>+</sup> T cells. In addition, we observed that blocking LFA-1 reduced CD8<sup>+</sup> T cell activation similar to CD226 loss. Thus, our results suggest that LFA-1 defects owing to CD226 loss may represent an important mechanism of TCR hypo-responsiveness and CD8<sup>+</sup>T cell dysfunction in tumors. The observations from *Braun et al.* showing actin cytoskeleton reorganization and LFA-1 polarization defects in *Cd226*<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells support this hypothesis (Braun et al.). Future work will be needed to understand how CD226 intrinsic signaling connects with TCR signaling and LFA-1 in CD8<sup>+</sup> T cells. CD226 contains at least two phosphorylation sites on tyrosine residue 322 and on serine residue 329 in its intracellular domain (Martinet and Smyth, 2015b; Shibuya et al., 1996). A recent study stressed the importance of the conserved Y<sup>322</sup>XN<sup>324</sup>X immunoglobulin tyrosine tail (ITT) motif in the NK cell cytolytic functions of CD226 (Zhang et al., 2015). This typical consensus binding sequence was indeed shown to connect CD226 with Grb2 SH2 domain, subsequently leading to the activation of Vav-1, phospholipase C-γ1 and ERK1,2 (Zhang et al., 2015). CD226 ITT motif could therefore represent a critical relay to amplify TCR downstream signaling. The decreased phosphorylation of ZAP-70, SLP76, LAT and ERK1,2 observed in CD8<sup>+</sup> T cells lacking CD226 and the recent evidence that Vav-1 associates with CD226 in CD4<sup>+</sup> T cells may support this hypothesis (Gaud et al., 2018). Surprisingly, no immune synapse, nor functional defects were observed by *Braun et al.* in CD8<sup>+</sup> T cells isolated from *Cd226*<sup>Y</sup> mice harboring a point of mutation on the Y319 of CD226 (mouse equivalent Y<sup>322</sup>) suggesting that this signaling is dispensable for CD226 synergy with LFA-1 and TCR co-stimulation (Braun et al.).

Although the importance of Ser 329 phosphorylation in the propagation of CD226 downstream signaling remains a matter of debate (Zhang et al., 2015), this residue could represent a critical link between TCR signaling, CD226 and LFA-1. Indeed, Ser 329 of CD226 was found to be phosphorylated upon CD3/CD28 stimulation and was required for CD226 physical association with LFA-1 in lipid raft (Shibuya et al., 1999; Shirakawa et al., 2005; Shirakawa et al., 2006).

It is now well established that many human tumors express specific antigens that can elicit CD8<sup>+</sup> T cell activation and the accumulation of CD8<sup>+</sup> effector T cells in the tumor microenvironment (Schumacher and Schreiber, 2015). Unfortunately, successful eradication of tumor cells by these TILs is often limited by diverse immunosuppressive mechanisms (Thommen and Schumacher, 2018). Among them, the up-regulation of multiple inhibitory receptors such as PD-1, Tim-3, TIGIT, and LAG-3 at the cell surface of TILs has emerged as major mechanisms of T cell dysfunction protecting tumors from immune attack (Thommen and Schumacher, 2018). Our study addressed an additional mechanism of cancer immune escape other than the classical immune checkpoints through the loss of a critical activation receptor, CD226. We presented considerable new evidence that tumor development favors the accumulation of dysfunctional CD8<sup>+</sup> T cells lacking CD226 expression. While almost all mouse CD8<sup>+</sup> T cells expressed CD226 in steady-state conditions, we found the progressive accumulation of TILs lacking CD226 with a CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>hi</sup> effector memory phenotype in the different tumor mouse models tested. Of note, CD226 loss mainly affected tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells since we observed that ova-specific purified CD226<sup>+</sup> OT-1 cells only converted into CD226<sup>-</sup> effector cells when transferred into ova-tumor bearing mice. Still, the differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells into hypo-reactive CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells may occur in other contexts as dysfunctional CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were detectable in most healthy donors. Whether this reflects a previous immune history of each individual or whether this represents a mechanism ensuring immune homeostasis by preventing over CD8<sup>+</sup> T cell activation remains to be more deeply investigated in the future.

Sustained expression of inhibitory receptors was so far considered as a key parameter allowing the identification of exhausted T cells in chronic infectious disease and cancer (Ahmadzadeh et al., 2009; Blackburn et al., 2009; Thommen et al., 2018). The successful reinvigoration of T<sub>ex</sub> functions by anti-PD-1 mAbs in chronic viral infections (Barber et al., 2006) and the impressive clinical results obtained by ICB in cancer patients (Robert et al., 2015; Robert et al., 2011; Topalian et al., 2012) support the importance of inhibitory receptors in T cell dysfunctions. Still, recent studies suggest that intratumor PD-1<sup>+</sup> exhausted T cells comprise a large spectrum of dysfunctional states (Bensch et al., 2018; Thommen et al., 2018). More importantly, it becomes evident that the potential of reinvigoration by ICB differs between CD8<sup>+</sup>

Tex subpopulations, meaning that additional alterations restrain exhausted T cell functions (Pauken et al., 2016; Philip et al., 2017; Scott et al., 2019).

Interestingly, both CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> cells were found among tumor infiltrating Tex cells with similar IC expression. Still, CD226<sup>-</sup> TILs consistently had lower effector functions and proliferation than their CD226<sup>+</sup> counterparts. In addition, anti-PD-1 immunotherapy failed to restore effector functions of TILs lacking CD226 expression. Thus, the absence of CD226 activation receptor might represent a yet underappreciated molecular mechanism limiting intratumor T cell responsiveness and correlating with their exhausted state independently of inhibitory receptors.

Although several predictive factors such as CD8<sup>+</sup> T cell infiltration (Tumeh et al., 2014), PD-L1 expression (Larkin et al., 2015) as well as tumor neo-antigen load (Rizvi et al., 2015) were identified in the past, it remains still unclear why some patients respond to ICB therapy while others do not. Thus, understanding the molecular mechanisms underlying effective responses to ICB therapy remains an intense field of investigation. Recently, it was demonstrated that PD-1/PD-L1 signaling suppresses T cell function via inactivation of CD28 signaling rather than TCR signaling (Hui et al., 2017) and that CD28/B7 pathway plays a crucial role in the efficacy of anti-PD-1 treatment (Kamphorst et al., 2017). However, the efficacy of anti-PD-1 may also rely on additional co-stimulatory signals as demonstrated by a recent study showing that PD-1/PD-L1 pathway is a negative regulator of CD226 signaling and that the anti-tumor effect of PD-1 and GITR antibody combination was abrogated in the absence of CD226 (Wang et al., 2018). Our study demonstrating that anti-PD-1 immunotherapy fails to restore effector functions of TILs lacking CD226 expression not only confirms the importance of signals provided by CD226 in anti-PD-1 efficacy but also highlights a novel mechanism of tumor resistance to ICB through the loss of CD226 expression. Thus, the extent of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells accumulating in the tumor microenvironment may represent an attractive parameter to consider for predicting anti-PD-1 efficacy in cancer patients especially given the high CD226 variability observed among cancer patients in our study.

A better understanding of the tumor signals involved in CD226 loss is required as they may represent interesting target to restore CD8<sup>+</sup> T cell anti-tumor functions and immune checkpoint efficacy. CD226 engagement by its ligands, especially CD155, was previously shown to decrease CD226 density at the cell surface of NK and T cells (Li et al., 2018b). The chronic stimulation of CD226 by tumors that frequently overexpress CD155 may therefore participate in CD226 loss as shown by *Braun et al.* (Braun et al.). Although, ligand induced CD226 recycling may account for CD226 loss, especially in the tumor context, our results suggest the existence of additional mechanisms occurring at the transcriptional level. Interestingly, we found that tumor induced CD226 loss was blunted in the absence of Eomes. Conversely, Eomes overexpression induced by agonists antibodies against CD137 promoted the accumulation of

dysfunctional CD226<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> T cells and once again this phenomenon was blunted in the absence of Eomes.

While these results demonstrate the implication of Eomes in CD226 loss, the mechanisms underlying CD226 transcriptional repression remains to be further addressed. Several studies suggested that the level of Eomes expression may distinguish two different T cell exhaustion stages induced by chronic antigen exposure (Blackburn et al., 2008; Buggert et al., 2014; Paley et al., 2012). In chronic viral infections, Eomes<sup>hi</sup> Tex cells expressed higher levels of inhibitory receptors, had reduced effector functions, and did not respond to anti-PDL1-mediated reinvigoration as compared to Eomes<sup>lo</sup> Tex cells (Blackburn et al., 2008; Paley et al., 2012). Dissecting the exact role of Eomes in T cell dysfunction was complicated by the function of this TF in effector CD8<sup>+</sup> T cell program and memory maintenance (Intlekofer et al., 2005; Kaech and Cui, 2012). Recent evidence suggests that low Eomes expression is required for anti-tumor effector T cell expansion and tumor control, while its overexpression favors T cell exhaustion and tumor outgrowth (Li et al., 2018a). Although Eomes was implicated in the up regulation of several immune checkpoints such as PD-1 and Tim-3, our results suggest that CD226 loss may also participate to the terminal exhaustion program associated with Eomes overexpression.

Although immunotherapy has represented a major breakthrough in cancer treatment, clinical responses are observed only in a fraction of treated patients and cancer types. Therefore, one of the major current research challenges now resides in the identification of novel mechanisms restraining anti-tumor immune functions. We and *Braun et al.* have demonstrated that CD226 expression represents a critical rheostat for anti-tumor functions of CD8<sup>+</sup> T cells and that Eomes-dependent and/or CD155-induced CD226 loss represents a major tumor immune escape mechanism.

#### **AUTHOR CONTRIBUTION**

Study conception and design: A.A., A.C.P., T.B., M.J.S and L.M. Acquisition of data: M.W., A.A., A.C.P., M.B., I.D., C.M.S., G.G., A.S., M-V.J., N.C., S.K., M.C., C.G., M.J.S and LM. Analysis and interpretation of data: M.W., A.A., A.C.P., M.B., T.B., L.D.S., L.M., and M.J.S. Drafting of manuscript: L.M. Critical revision and editing: T.B., M.J.S and L.M. Provision of key materials: B.C., E.V., A.D., M.A., M.P., and H.A.L.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

We thank Marie Tosolini, Liam Town and Brodie Quine and the members from the core facilities at the Cancer Research Center of Toulouse and QIMR Berghofer. We acknowledge the contribution of Gisèle Froment, Didier Nègre and Caroline Costa from lentivectors production facility of SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL). We thank Nathalie Rufer for providing PE-labeled NY-ESO-1 multimers and Céline Colacios for breast cancer sample data. We thank Pierre Cordelier and Bettina Couderc for their help on lentiviral vector. The “Genomic and Immunology of myeloma” laboratory at CRCT is supported by the “Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer” Program Grants (ARC PGA1-20160203788 and PGA1-20190208630). This work was supported by grants from the Institut National du Cancer (PLBIO R16100BB), Cancer Research Institute/Bristol-Myers Squibb CLIP Grant and the “Fondation Toulouse cancer santé” IUCT-O translational research program. M.W and A.C.P were supported by la Ligue contre le cancer PhD fellowships. T.B. was supported by an EMBO long-term Fellowship (ALT945-2015) and a National Health and Medical Research Council of Australia (NH&MRC) Early Career Fellowship (1124690). M. J. S. was supported by a NH&MRC Senior Principal Research Fellowship (1078671) and Program Grant (1132519). The results shown here are in part based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>.

## **CONFLICT DISCLOSURE**

M.J. Smyth has research agreements with Bristol Myers Squibb and Tizona Therapeutics. L.M has research agreements with Bristol Myers Squibb, Sanofi-Aventis and Roche.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: The absence of CD226 identifies hypo-responsive human CD8<sup>+</sup> T cells.

(A) Representative FACS histogram and graph showing the expression of CD226 by healthy donor (HD) peripheral blood CD8<sup>+</sup> T cells. n=77 HD. (B) Graph showing the relative frequency of the indicated TCRv $\beta$  among CD226<sup>-</sup> (blue) and CD226<sup>+</sup> (red) CD8<sup>+</sup> T cells. Representative from n=20 HD. (C) Representative FACS histograms and graph showing the percentages of CD226<sup>-</sup> in the indicated CD8<sup>+</sup> T cell subsets. n = 77 HD. (D) Representative FACS histograms and graph recapitulating the proliferation of purified CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tn, Tcm and Tems activated by  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28 microbeads for 6 days. n=7-14 HD. (E) Representative FACS plots showing the proliferation of purified CD8<sup>+</sup> T cells activated by allogeneic DCs or CMVpp65 peptides for 6 days. n = 3 HD. (F) Graph showing the concentrations of the indicated cytokines in the culture supernatants of purified CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems stimulated with  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28 microbeads for 48 hrs. Mean  $\pm$  SD from triplicate wells, representative experiments of n=5 HD. (G) Representative FACS plots showing the expression of CD107a degranulation marker and the intracellular production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells activated by Fc $\gamma$ R<sup>+</sup> P815 cell line coated with anti-CD3 mAbs (OKT3, 1 $\mu$ g/ml). n=5 HD. (H) Representative graph showing calcium influx by CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells activated with  $\alpha$ -CD3 (OKT3, 10 $\mu$ g/ml). Representative from n=4 HD. (I) Graph showing the expression of phosphorylated (p) SLP76 by CD226<sup>-</sup> or CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems stimulated with  $\alpha$ -CD3 (OKT3, 10 $\mu$ g/ml) for 0, 1 or 5 minutes. n=5 HD. (J-K) Purified CD226<sup>-</sup> or CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems were stimulated with  $\alpha$ -CD3 (OKT3, 10  $\mu$ g/ml) for 0, 1 or 5 minutes. Western blots using antibodies directed against the indicated total and phosphorylated (p) proteins are shown. Representative experiment from n=3 HD. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing an individual HD. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's correction (C). Statistical differences between two groups were determined using Mann-Whitney test (D), unpaired (F) or paired T test (I). \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

**Figure 2: The absence of CD226 alters TCR-induced effector program of CD8<sup>+</sup> T cells.**

**(A-F)** A global transcriptomic analysis of HD resting CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems (n=6/group) or activated (ACT; n=4/group) by  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28 for 24 hrs was performed by RNA sequencing. **(A)** PCA analysis showing different expression gene profiles between CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tem samples activated or not. **(B)** Venn diagram showing the number of genes differentially expressed between the indicated groups of CD8<sup>+</sup> Tems ( $p < 0.01$ , FC > 2). **(C)** Volcano plots showing differentially expressed genes between CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tem samples, activated or not. **(D)** Log-normalized gene-expression heatmap showing the hierarchical clustering of CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tem samples according to differentially expressed genes between ACT CD226<sup>-</sup> and ACT CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems. **(E)** Table showing GO term analysis performed on ACT CD226<sup>+</sup> vs ACT CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tem differentially expressed genes. The associated NES and Adjusted  $p$  value was indicated. **(F)** Graph showing gene set enrichment of ACT CD226<sup>+</sup> vs ACT CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tem specific genes analyzed in C7 immune data sets. NES and FDR were plotted for each comparison.

**Figure 3: Mechanisms underlying CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction.**

**(A-B)** CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems were transduced with GFP control or CD226-GFP Baboon retroviral envelope glycoprotein lentiviral vectors (BaEV-LVs) for 48 hrs. **(A)** FACS histograms showing GFP expression in the corresponding cultures. **(B)** FACS histograms showing the expression of CD226, CD107a, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in transduced cells (GFP+) and untransduced cells (GFP-) after stimulation with  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28 microbeads. Representative experiment from n=4. **(C-D)** Representative FACS plot **(C)** and graphs **(D)** recapitulating the percentages of CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells expressing LFA-1 open conformation after 2hrs in presence or not of  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28 microbeads. From n=5 HD. **(E)** Graph recapitulating the intracellular production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems cells activated by  $\alpha$ -CD3 (OKT3, 10 $\mu$ g/ml) for 6hrs in the presence of control Ig (cIg) or blocking anti-LFA-1 mAbs (aLFA-1). n=8 HD. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis **(E)**. Statistical differences between two groups were determined using unpaired T test **(D)**. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 4: CD226 absence identifies dysfunctional CD8<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes.**

**(A)** Representative FACS histogram and graph showing the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells isolated from the bone marrow (BM) of newly diagnosed multiple myeloma patients (MM; n=177) and healthy donors (HD; n = 20). **(B)** Representative FACS histograms and graph showing the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells by paired BM (TIL) or blood (PBMC) CD8<sup>+</sup> T cells isolated from MM patients (n = 10). **(C)** MM patient CD138<sup>-</sup> BM cells were stained with CTV and stimulated with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads for 5 days. Representative histograms and graphs recapitulating the proliferation of CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs. n=20 MM patients. **(D)** Representative FACS plots and graphs recapitulating the expression of CD107a degranulation marker and the intracellular production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by MM patients' CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs stimulated with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads for 6 hours. n = 36 MM patients. **(E)** Representative FACS plots showing CD8<sup>+</sup> BM T cells from HLA-A\*02<sup>+</sup> MM patients stained with HLA-A\*02-NYESO1-PE multimers and their CD226 expression. **(F)** MM patient CD138<sup>-</sup> BM cells were stimulated with HLA-A\*02-NY-ESO-1 specific peptide (1 $\mu$ g/ml) for 6hrs. Representative dot plots as well as pooled data from n=5 HLA-A2<sup>+</sup> MM patients with positive NY-ESO response are shown. **(G)** Graph showing the percentage of CD226<sup>-</sup> cells among CD8<sup>+</sup> TILs isolated from ovarian cancer (n = 8) and breast cancer patients (n = 10). **(H)** Graph recapitulating the intracellular production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  by ovarian cancer patients' CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs stimulated with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads for 6hrs. n=7 patients. **(I)** CD226 expression correlates with breast cancer prognosis. Graph showing Kaplan–Meier disease-free (left) and overall (right) survival estimates for CD226<sup>high</sup> (>median value, n=503) and CD226<sup>low</sup> (<median value, n=503) Breast Cancer patients. RNA sequencing data involving 1006 invasive breast Cancer (BRCA) patients from the TCGA database. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing an individual cancer patient. Statistical analyses between two groups were performed using a Mann Whitney U test (**A, C, D**) or paired T test (**B, F, H**). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 5: Tumor development promotes dysfunctional CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell accumulation.**

**(A-F)** C57BL/6 WT mice were left untreated or injected with B16F10 melanoma cell line (s.c  $10^5$  cells) or VK12653 myeloma cell line ( $2 \times 10^6$  cells, i.v). **(A)** Representative FACS histograms showing CD226 expression by CD8<sup>+</sup> Tem (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>), Tcm (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>+</sup>) and Tn (CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>+</sup>) cells isolated from spleen of non-tumor bearing mice or indicated tumor lesions. Pooled data from at least 4 independent experiments. **(B)** Graph showing the percentages of CD226<sup>-</sup> cells among Tn, Tcm and Tem CD8<sup>+</sup> TILs isolated from B16F10 tumors 19 days post injection. Pooled data from at least 4 independent experiments. **(C)** Graph showing the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tems isolated from the spleen of WT C57BL/6 mice and from tumor, draining lymph nodes (DLN), non-DLN and spleen of B16F10 tumor-bearing mice at day 19 post-tumor inoculation. **(D)** Graph recapitulating the percentages of tumor infiltrating CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems expressing Ki67 proliferation marker 19 days after B16F10 injection. **(E)** Graphs showing the intracellular production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TILs isolated from B16F10 bearing mice upon re-stimulation with  $\alpha$ -CD3/CD28 for 6hrs. Pooled data from 3 independent experiments n=12. **(F-H)**  $10^6$  ova-specific CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> naïve T cells were isolated from the spleen of OT-1 mice and injected i.v into *Rag2<sup>-/-</sup>gc<sup>-/-</sup>* mice bearing B16F10 or B16F10-ova tumors. **(F)** Schematic representation of the experimental design. **(G-H)** Representative histograms **(G)** and graph **(H)** showing CD226 expression on OT-1 CD8<sup>+</sup> Tems isolated from the spleen or tumors 7 days post transfer. Pooled data with from 2 experiments. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis **(B, C, H)** and differences between two groups were assessed using paired T test **(D, E)**. \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 6: Tumor-induced CD226 loss limits immune checkpoint blockade efficacy.**

**(A)** Representative Tsne plots calculated on CD8<sup>+</sup> TILs isolated from B16F10 bearing mice showing the normalized expression of CD62L, CD44, PD-1, CTLA-4, LAG3 and CD226 (red: highly expressed/yellow-orange: middle expression and blue: no expression). The gates indicate TILs with an exhausted phenotype. **(B-C)** Graphs comparing the expression of the indicated immune checkpoints on CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs isolated from **(B)** B16F10 bearing mice (n=7 mice, representative experiment of 3) or **(C)** ovarian cancer samples (n = 8 patients). **(D-F)**. C57BL/6 WT mice were injected with B16K1 MHC-I overexpressing melanoma cell line and were subsequently treated with Ig control or anti-PD-1 mAbs. **(D)** Schematic representation of the experimental design and graph showing the tumor volume in the indicated groups of mice. Data representative of 2 independent experiments with n=9-10. **(E)** Representative FACS plots and graphs showing the percentages of Ki67<sup>+</sup> proliferating CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs isolated from Ig control (clg) or anti-PD-1 treated B16K1 bearing mice. Pooled data from 3 independent experiments with n=10-12. **(F)** FACS plots and graph showing the intracellular production of IFN- $\gamma$  by CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs isolated from clg or anti-PD-1 treated B16K1 bearing mice upon in vitro re-stimulation with  $\alpha$ -CD3/CD28 mAbs for 6hrs. Pooled data from 3 independent experiments with n=10-12. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing an individual mouse. **(G)** Groups of C57BL/6 wild type (WT) and *Cd226*<sup>-/-</sup> mice (n = 5-10/group) were injected s.c. with 1x10<sup>5</sup> MC38 colon adenocarcinoma cells. Mice were treated on days 10, 12, 14 and 16 (relative to tumor inoculation) with clg (250 $\mu$ g i.p.) or anti-PD-1 (250 $\mu$ g i.p., RMP1-14) as indicated. Some groups of WT mice received clg (250 $\mu$ g i.p.) or anti-CD226 (250 $\mu$ g i.p., 480.1) on days 9, 10, 14, 17, 20, 24 and 28. Tumor area (mm<sup>2</sup>) was measured every 2-4 days. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis **(D-G)** and differences between two groups were assessed using paired T test **(B-C)**. \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 7: CD226 loss depends on Eomes expression.**

**(A)** Graph showing normalized Eomes mRNA transcripts of CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tem activated (ACT) with  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28 microbeads or not (NS) detected by RNA sequencing depicted in Figure 2. **(B)** Representative FACS plots and graphs showing Eomes expression by CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from the blood of HD (n = 15) and from the BM of newly diagnosed MM patients (n = 22). **(C-E)** CD4<sup>cre</sup>x Eomes<sup>fl/fl</sup> (Eomes<sup>KO</sup>) and CD4<sup>WT</sup>x Eomes<sup>fl/fl</sup> (Eomes<sup>WT</sup>) mice were injected with B16F10 tumor cells. Representative FACS plots **(C)** and graphs **(D)** recapitulating the expression of Eomes among CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> tumor infiltrating CD8<sup>+</sup> Tems. **(E)** Graphs showing the percentages of CD226<sup>-</sup> cells among CD8<sup>+</sup> TILs isolated from Eomes<sup>KO</sup> and Eomes<sup>WT</sup> mice. Data are from 2 pooled experiments with n = 8-10 mice/group. **(F-G)** C57BL/6 WT mice were treated with anti-CD137 mAbs (100 $\mu$ g; 3H3, i.p) for the indicated period. **(F)** Schematic representation of the experimental design and representative histograms showing Eomes and CD226 expression at the indicated time in anti-CD137 treated WT mice. **(G)** graphs showing the percentage of Eomes<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen of C57BL/6 WT mice treated with anti-CD137 mAbs. **(H)** Graph showing the expression of Eomes among CD8<sup>+</sup> T cells isolated from clg- or anti-CD137-treated mice. n=10 mice/group from 2 pooled experiments. **(I-J)** FACS plots **(I)** and graph **(J)** showing the percentage of CD226<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> Tems isolated from the spleen of Eomes<sup>KO</sup> and Eomes<sup>WT</sup> treated with anti-CD137 mAbs. n = 14 mice/group from 2 pooled experiments. **(K)** Graph showing the percentages of CD226<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen of CD155<sup>KO</sup> and C57BL/6 WT mice treated with anti-CD137 mAbs (red) or IgG control (black). **(L-M)** Naïve CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were purified from WT mice and transferred into *Rag2*<sup>-/-</sup>*gc*<sup>-/-</sup> mice. At day 7 mice were injected with clg or anti-CD137 mAbs. **(L)** Schematic representation of the experimental design. **(M)** Representative FACS plots and graph showing the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen of the indicated groups of mice at day 17. n=10 mice/group from 2 pooled experiments. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple group were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis (**G, H, K**) and differences between two groups were assessed using paired t test (**B**) or Mann-Whitney (**A, D, J, M**). \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 8: CD226 loss restrains CD8<sup>+</sup> T cells antitumor functions.**

**(A-B)** C57BL/6 WT mice were treated for 2 weeks with anti-CD137 mAbs (100 $\mu$ g; 3H3, twice a week) and splenic CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were sorted by flow cytometry and re-stimulated with  $\alpha$ -CD3/CD28 mAbs. **(A)** Representative histogram showing the proliferation of CTV-labeled CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. **(B)** Graphs showing IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels in the supernatant of the corresponding cultures after 24 hrs of stimulation. Data are pooled from 5 independent experiments. **(C)** OT-1 mice were treated with anti-CD137 mAbs for 2 weeks and splenic CD8<sup>+</sup> T cells were purified and activated *in vitro* with  $\alpha$ -CD3/CD28 mAbs or ova-peptide for 6hrs. Graphs showing the expression of CD107a and TNF- $\alpha$  by CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> OT-1 cells. n=7 mice/group from 2 independent experiments. **(D-F)** TCR transgenic *Pmel* mice were stimulated with agonistic CD137 mAbs and sorted into CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. B16F10 tumor (10-20mm<sup>2</sup>) bearing mice were left untreated (control) or injected with the indicated *Pmel* sorted T-cells. Mice pre-conditioned by cyclophosphamide injection were stimulated with a recombinant adenoviral vector vaccine expressing hgp100 and three intratumor injections of TLR ligands CpG and poly(I:C). **(D)** Schematic overview of ACT model, where C= cyclophosphamide, V= Adenovirus encoding hgp100 (=Pmel) and TLR= intra-/peri-tumoral injection of CPG and poly(I:C). **(E-F)** Graph showing tumor area **(E)** and Kaplan-Meier survival curves **(F)** of B16F10 bearing mice. Data depicted are representative of two experiments. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing the mean of one experiment. Statistical differences between multiple group were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis **(C, E)** and differences between two groups were assessed using Mann-Whitney **(B)** or Mantel-Cox log rank **(F)**. \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## STAR Methods

### Contact for Reagent and Resource Sharing

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Ludovic Martinet ([ludovic.martinet@inserm.fr](mailto:ludovic.martinet@inserm.fr))

### Human samples

*Healthy donors.* PBMC obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Toulouse) were isolated by Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) density centrifugation. Unprocessed human bone marrow (BM) aspirates from healthy donors were purchased from Lonza (Switzerland).

*Cancer patient's samples.* Fresh BM aspirates and peripheral blood from patients with myeloma were collected at the time of diagnosis or relapse in the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-oncopole (IUCT-O, Toulouse) through the intergroupe francophone du myélome network. BM samples were depleted of malignant plasma cells using anti-CD138-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, France). Samples from newly diagnosed breast or ovarian cancer patients were obtained from surgical resections performed in the IUCT-O (Toulouse, France). Tumor specimens were processed by mechanical dissection and single-cell suspensions were cryopreserved. All cancer patients gave written informed consent and collection was approved by French Committee for the Protection of Persons (CPP; DC-2012-1654) as well as by local IUCT-Oncopole review boards.

### Flow cytometry

Single cell suspensions were stained according to standard protocols with previously described anti-mouse and human antibodies listed in the STAR\*Methods section. Antibodies were purchased from miltenyi biotec, eBioScience, BioLegend, or BD Biosciences. Surface staining was performed with mAbs for 30min at 4°C in PBS supplemented with 2% FCS and 2 mM EDTA. MM patient CD8<sup>+</sup> T cells were stained with PE-labeled HLA-A2/NY-ESO-1<sub>157-165</sub> (SLLMWITQA) multimers as described previously (Guillerey et al., 2018). For the intracellular staining, cells were fixed and permeabilized using BD Cytotfix/Cytoperm permeabilization kit (BD Biosciences) or Transcription Factor Fixation/Permeabilization kit (Thermofisher). Data were collected with LSR II or Fortessa X20 flow cytometers (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (TreeStar). Dead cells and doublets were excluded by LiveDead staining (Thermofisher).

### **CD8<sup>+</sup> T cell isolation**

CD8<sup>+</sup> T cells were enriched with the appropriate negative selection kits (Miltenyi biotec) from Human PBMCs, MM patient's BM samples, Ovarian cancer biopsies, mouse spleen or tumors and were stained in PBS with 0.5% SVF and 2 mM EDTA containing fluorochrome-conjugated antibodies listed in the listed in STAR\*Methods section. The indicated CD8<sup>+</sup> T cell subsets were then highly purified based on CD226, CD45RA and CD62L expression (human) or CD226, CD44 and CD62L expression (mouse) using Aria Fusion (BD biosciences) or MoFlo Astrios (Beckman Coulter) cell sorters.

### **Human T cell functional assays**

The indicated CD8<sup>+</sup> T cell subsets purified from HD or cancer patients were stimulated with plate bound anti-CD3 mAbs (clone OKT3, Biotec), anti-CD2/CD3/CD28 microbeads (T cell expansion kit, Miltenyi Biotec), CytoStim (Miltenyi Biotec), monocyte-derived allogeneic mature dendritic cells, CMVpp65 peptide pools (PepTivator® Miltenyi Biotec) or NY-ESO-1157-165 analog (SLLMWITQA, Peptide 2.0 Inc, 1 µg/ml) in RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (ThermoFisher Scientific) and L-glutamine (SIGMA Aldrich). Intracellular cytokine staining was performed after 6 hours in the presence of APC-conjugated anti-CD107a (H4A3, BD bioscience) and Golgiplug (BD biosciences). Alternatively, cells were stained with Cell Trace Violet (CTV, Thermo Fisher Scientific) prior to stimulation followed by CTV dilution assessment 5 days later. Cytokine levels were measured in the cell culture supernatants by CBA (BD Biosciences) after 48 hrs. Cytotoxic capacities of CD8<sup>+</sup> T cells were assessed in co-cultures with P815 mastocytoma cell line coated with the indicated concentrations of anti-CD3 mAbs at a 2:1 effector: target ratio. Where indicated, mAb against TIGIT (Clone MBSA43, Thermo Fisher scientific), CD96 (Clone NK92.39, Biolegend), CD226 (clone DX11, Abcam), CD112 (clone TX31, Biolegend), CD155 (clone SKII.4, Biolegend) or LFA-1 (Clone TS1/18, BioXcell) or irrelevant IgG1 (clone MG1-45, Biolegend) were added to cultures at a final concentration of 10µg/ml. For the detection of the high-affinity form of LFA-1, CD8<sup>+</sup> T cells were activated for 2hrs. Previously described mAbs (Petit et al., 2016) directed against the extended/open high affinity conformation of LFA-1 (2 µg/ml; clone 24, Biolegend) were added into the culture for the last 30 minutes of the assay.

### **Monocyte-derived mature dendritic cell**

Monocytes were isolated from PBMCs with CD14<sup>+</sup> immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec) as described by the manufacturer recommendations. Isolated CD14<sup>+</sup> cells were cultured in complete RPMI 1640 medium with GM-CSF (100 ng/mL) and IL-4 (50 ng/mL) for 5 days. Mature dendritic cells were obtained by adding TNF-α (50 ng/ml), IL-1β (50 ng/ml) and IL-6 (50 ng/ml) for two additional days and used in functional assays after phenotypic analysis.

### **Lentiviral vector production**

Human tagged CD226 cDNA (NM\_006566, Origene) was cloned into PCDH-EF1-copGFP-T2A-Puro vectors kindly provided by Kazuhiro Oka (Addgene plasmid # 72263; <http://n2t.net/addgene:72263> ; RRID : Addgene\_72263). Lentivirus pseudotyped with a baboon retroviral envelope glycoprotein (BaEV-LVs) and measles virus glycoprotein-displaying LVs (hemagglutinin and fusion protein LVs [H/F-LVs]) that efficiently transduce IL-7 stimulated primary human T lymphocytes were used (Girard-Gagnepain et al., 2014; Levy et al., 2017). Self-inactivating HIV-1–derived vectors encoding CD226 and/or GFP, were generated by transfection of 293T cells as described in detail elsewhere (Levy et al., 2017). Eighteen hours after transfection, the medium was replaced by Opti-MEM supplemented with HEPES (Invitrogen). Viral supernatants were harvested 48hrs after transfection and filtered. The vectors were concentrated at low speed overnight at 3000g at 4°C. Infectious titers (in transduction units [TU]/ml) were determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS) of target cells using serial dilutions of the supernatants added to the 293T cells.

### **Transductions of human CD8<sup>+</sup> T cells**

FACS sorted effector memory CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were cultured in RPMI complete medium supplemented with IL-7 (1 ng/ml) for two days and transduced with either control-GFP or CD226-GFP lentivirus on retronectin-coated 96-well plate at a MOI of 10. After 48hrs, cells were analyzed for GFP expression and tested in functional assays.

### **TCR signaling analysis**

Sorted CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tem cells were stimulated with anti-CD3 mAbs (10µg/ml; UCHT-1- Thermo fisher) followed by goat anti-mouse Fab'2 secondary antibody (20µg/mL; Jackson ImmunoResearch) cross-linking or with plate bound anti-CD3 (OKT3, eBiosciences, 10µg/ml) for indicated time. Cells were then homogenized in RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with complete protease inhibitor tablet (Roche). Cell extracts were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad). Immunoblots were performed with phospho-specific antibodies (Cell Signaling Technology) to PLC  $\gamma$ 1 (Tyr783), ZAP-70 (Tyr319), LAT (Tyr191), ERK1/2 (Thr202 and Tyr204) and AKT (Ser473) followed by appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Cell Signalling technology). The proteins were visualized by ECL-Plus (GE Healthcare) using Pxi (Syngene) or ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences) imaging systems. For phospho-specific flow cytometry, purified CD8<sup>+</sup> T cells were incubated with biotin-conjugated anti-CD3 (10µg/ml; OKT3) for 15 min on ice, washed with ice-cold PBS and incubated with cross-linking anti-biotin secondary antibody on ice for additional 15 minutes.



Cells were then stimulated at 37°C for the indicated times. Cells were fixed with pre-warmed Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 10 min and permeabilized with Perm III solution (BD Biosciences) for 30 min on ice. Cells were washed in FACS buffer solution and stained with anti-SLP76 (Y128) and anti-CD247 (Y142) for 1 hr and phosphoproteins were detected by flow cytometry. Investigation of intracellular calcium flux in CD8<sup>+</sup> T cells was performed according to previous protocols (Lee et al., 2012) using Calcium Assay kit (BD Biosciences). Briefly calcium dye-loaded CD8<sup>+</sup> T cells were coated with anti-CD3 mAbs (10µg/ml; OKT3) for 15min on ice, washed with ice-cold PBS and activated with goat anti-mouse Fab'2 secondary antibody at 37°C (13 µg/ml) before flow cytometry analysis of calcium influx.

### **Library construction for RNA sequencing.**

Total RNA was extracted from freshly FACS purified CD226<sup>-</sup> or CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells or activated for 24 hr with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads (T cell expansion kit, Miltenyi Biotec) using RNeasy micro kit (Qiagen) according to the manufacturer's instruction. The quality of the isolated total RNA from each sample was checked on 2200 TapeStation System (Agilent, Santa Clara, USA) using the RNA ScreenTape assay and the quantitation was performed using the NanoVue Plus Spectrophotometer (Biochrom Ltd, Cambridge, UK). 100-300 ng of total RNA per sample with a RNA integrity number >8 were used for library preparation. The RNA-Seq library preparation was performed using TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina, San Diego, Calif) according to the manufacturer's instructions (High Sample Protocol). The RNA-Seq libraries were checked on the 2200 TapeStation System (Agilent) using the High-Sensitivity DNA 1000 ScreenTape assay. Libraries were quantified by qPCR on a LightCycler 480 System (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, Calif) using KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms (Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts). Libraries were then pooled in equal quantities, checked and quantified using same techniques (2200 TapeStation and LightCycler 480). Paired-end sequencing (2 x 150 bps) of these libraries was performed on a NextSeq 500 Illumina sequencing platform (Illumina) by 2 successive runs using NextSeq 500 High Output kit v2 (Illumina) generating in average 20 million pairs of reads per sample. RNA-Sequencing data from the CD138-fractions of 73 newly diagnosed MM patient BM aspirates have already been described (GSE63473; (Nakamura et al., 2018)).

## **RNA-seq bioinformatic analysis**

Fastq files were aligned to the Ensembl GRCh38 human reference genome using STAR (version 2.4.2 (Dobin et al., 2013) and gene expression summary was obtained using the Subread featurecount algorithm (version 1.4.6) (Liao et al., 2014). Read counts were normalized using the DESeq function (Love et al., 2014) retaining only genes expressed (more than 10 aligned reads) in at least 50% of samples. *Principal component analysis* (PCA) was created from normalized reads as described previously (Varet et al., 2016). The R packages Sartools (<https://github.com/PF2-pasteur-fr/SARTools>) using DESeq2 (Love et al., 2014) was used to perform differential gene expression analysis (Love et al., 2015). Genes differentially expressed with p value <0.01 and FC>2 with Benjamini-Hochberg (BH) multiple testing correction at 1% false-discovery rate (FDR) were considered. To perform the gene set enrichment analysis, R fgSEA package was used to derive the absolute enrichment scores using C7 immunologic signatures (The signatures were generated by manual curation of published studies in human and mouse immunology) of the Molecular Signature Database version 6.0 (Subramanian et al., 2005).

## **TCGA transcriptomic analysis**

Gene expression data (RNA-seq) of TCGA breast cancer cohort (BRCA) was accessed through the cBioportal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org>) using the R-based package CGDS-R and following the TCGA guidelines for the use of TCGA data (<https://cancergenome.nih.gov/>). For Kaplan-Meier plots, optimal cutoffs were determined with the survival R package and the Log-Rank p values were corrected using the Benjamini-Hochberg method.

## **Mouse Models**

Mouse strains were maintained either in the SPF animal facility of the US006 CREFRE-Inserm/UPS which is accredited by the French Ministry of Agriculture (accreditation number A-31 55508) or in the SPF animal facility of the QIMR Berghofer Medical Research Institute. Tumor experiments used both male and female mice between 6 and 12 weeks of age. Donors and recipients of adoptive T cell transfers were sex matched. Animal experiments were conducted and approved by the QIMR Berghofer Medical Research Institute Animal Ethics Committee and the Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (APAFIS#5614-20 16060815487810 v4) and are in compliance with the French and Australian regulations on care and protection of laboratory animals. For survival analysis, mice were monitored daily according to institutional ethic guidelines, and were euthanized when mice developed signs of reduced mobility including paralysis, hunched posture, or respiratory distress. All mice used in this study were on a C57BL/6 genetic background.

WT mice were purchased from Janvier laboratories or from the Walter and Eliza Hall institute for Medical Research. *OT1* (Hogquist et al., 1994), *Pmel-1* (Overwijk et al., 2003), *Cd226*<sup>-/-</sup> (Gilfillan et al., 2008), *Rag2*<sup>-/-</sup>*Il2rg*<sup>-/-</sup> (von Scheidt et al., 2014) and *Cd8*<sup>-/-</sup> (Fung-Leung et al., 1991) have already been described. *Cd155*<sup>-/-</sup> mice (Kamran et al., 2013) were kindly provided by the Dr Yoshimi Takai (Kobe University, Kobe, Japan). *Eomes*<sup>f/fi</sup> x *Cd4*<sup>CRE</sup> mice (Zhu et al., 2010) were kindly provided by Anne Dejean (CPTP institute, Toulouse, France).

### **Cell lines, cell culture, plasmids and transduction**

Well described MC38 colon cancer cell line, B16F10 melanoma cell line and variants expressing constitutively OVA protein (B16F10-OVA) or stably expressing the MHC-I molecule H-2Kb (B16K1) (Porgador et al., 1989) were used in this study. Cells were cultured in DMEM medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Cells were tested negatively for mycoplasma contamination and maintained in culture for a limited number of passages. Transplantable Vk\*MYC MM cell line (Vk12653) were kindly provided by Bergsagel. L (Mayo clinic, USA). Transplantable MM cell line Vk12653 were generated and expanded as previously described (Chesi et al., 2008; Guillerrey et al., 2015). Briefly, these cells were maintained in *Rag2*<sup>-/-</sup>*Il2rg*<sup>-/-</sup> mice to avoid contamination with host-derived lymphocytes as described previously (Guillerrey et al., 2015).

### **Mouse tumor implantation, tumor digestion and tumor volume measurements**

The left flank of mice was shaved and B16F10 ( $5 \times 10^5$ ), B16-OVA cells ( $5 \times 10^5$ ), B16K1 cells ( $10^6$ ), MC38 ( $2 \times 10^6$ ) were injected subcutaneously (s.c.) in 100  $\mu$ l of PBS. Tumor volume were estimated by measuring the tumor size in two dimensions using a caliper. The tumor volume was calculated according the formula (length x width<sup>2</sup> / 2). Tumors were measured three times per week. Mice were sacrificed at the indicated time points or when the estimated tumor volume reached  $> 2 \text{ cm}^3$ . TILs were analyzed as previously described. Briefly, solid tumors were excised, manually dissociated and digested enzymatically with Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) and then incubated at 37°C for half an hour. After incubation, digested tumors were mashed through 70 $\mu$ m filters and washed with PBS before TILs analysis. Vk12653 MM cells ( $2 \times 10^6$ ) were injected i.v. into tail vein of indicated strains of mice. The percentage of monoclonal Ig in the serum was quantified by serum protein electrophoresis (Sebia Hydrasys system). The phenotype, percentage and number of BM B220<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>CD155<sup>+</sup>PCs and CD8<sup>+</sup> TILs were analyzed by flow cytometry at the indicated time points as described previously (Guillerrey et al., 2015).

### **Mouse T-cell functional assays**

For cytokine production assays, total splenocytes, TILs or freshly isolated CD8<sup>+</sup> T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 (3µg/ml; 145-2C11, BioLegend) and anti-CD28 (1 µg/ml; 37.51, BioLegend), ova-peptide (Sigma, 10 µg/mL) or with Phorbol myristate acetate (PMA; 50ng/ml, Sigma) and ionomycin (1µg/ml, Sigma) in the presence of Golgi Plug (BD biosciences) and/or Golgi Stop (BD Biosciences) for 5hrs. Intracellular cytokine staining was performed as described above. For T cell proliferation assay, freshly sorted CD8<sup>+</sup> T cells were loaded with CTV (Thermofisher) according to manufacturer's instructions prior to stimulation. CTV dilution was analyzed after 4 days. Cytokine levels were measured in the corresponding cell culture supernatants by Cytometric Bead Array (CBA from BD Biosciences) after 24-48 hrs.

### **Cancer Immunotherapy**

Immune checkpoint blockade treatment (ICB treatment) was started on palpable B16K1 tumors (50-100 mm<sup>3</sup> volume). Mice received three i.p. injections of anti-PD-1 mAb (200µg; RMP1-14 clone BioXcell) or rat irrelevant IgG isotype controls (200µg; 2A3, BioXcell) at three- to four-day intervals. Tumors were measured three times per week as described above. TILs phenotypic and functional analysis was performed at the end of the treatment, 19 days after B16K1 tumor cell injection. Alternatively, MC38 (1 x 10<sup>5</sup>) were s.c. injected into the indicated strains of mice in a final volume of 200µl (day 0). Mice were treated on days 10, 14, 18 and 22 (relative to tumor inoculation) with clg (250µg i.p.; Mac4, BioXCell), anti-PD-1 (250µg i.p., RMP1-14, BioXCell) or anti-CTLA4 (100µg i.p., 9D9 IgG2a, BMS). Some groups of mice received clg (250µg i.p.) or anti-DNAM-1 (250µg i.p., 480.1) on days 9, 10, 14, 17, 20, 24 and 28. Digital callipers were used to measure the perpendicular diameters of each individual tumor.

### **TNFR agonist treatment.**

C57BL/6 *WT*, *Eomes<sup>f/f</sup> x Cd4<sup>CRE</sup>*, *OT-1* or *Pmel-1* mice were treated by i.p. injection with anti-CD137 mAbs (100µg; 3H3, BioXcell, twice a week), anti-mouse OX40 (200µg; OX-86, BioXcell, twice a week), anti-mouse GITR (200µg; DTA-1-, BioXcell, twice a week) or with control IgG (HRPN, BioXcell). After 2-3 weeks, lymphoid organs were isolated for CD8<sup>+</sup> T cell phenotypic analysis and functional assays. For dose-response experiments, C57BL/6 mice were treated with 1, 10 or 100µg of anti-CD137 mAbs twice a week for 2 weeks.

### **Adoptive T cell Transfer experiments**

Naïve CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from the spleen of OT-1 or WT mice using mouse CD8<sup>+</sup> T cell enrichment kit (Miltenyi Biotec) followed by FACS purification using FACSaria™ Fusion (BD biosciences). 1 x 10<sup>6</sup> OT-1 were adoptively transferred by tail vein injection into *Rag2*<sup>-/-</sup>*Il2rg*<sup>-/-</sup> or *Cd8a*<sup>-/-</sup> mice injected with B16F10 or B16F10-OVA tumors for 6 days (5 x 10<sup>5</sup>; s.c). One week later, CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from the spleen and tumors and analyzed for CD226 expression as described above. Alternatively, 1 x 10<sup>6</sup> WT CD8<sup>+</sup> T cells were transferred by tail vein injection into *Rag2*<sup>-/-</sup>*Il2rg*<sup>-/-</sup> mice, blood was collected by retro-orbital puncture under isoflurane anesthesia 7 days later and CD8<sup>+</sup> T cell phenotype was analyzed by flow cytometry. Mice were then treated by 3 injections of anti-CD137 mAbs (100µg; 3H3 – BioXcell; i.p) or control IgG (HRPN – BioXcell) and lymphoid organs were collected for subsequent CD8<sup>+</sup> T cells analysis by flow cytometry.

### **Adoptive Cell Transfer (ACT) Therapy**

ACT immunotherapy was performed as previously described (Glodde et al., 2017). Briefly, when s.c. transplanted B16F10 melanomas reached a size of > 5mm in diameter mice were preconditioned by a single i.p. injection of 2mg (~100mg/kg) cyclophosphamide in 100 µl PBS followed by intravenous delivery of 1 x 10<sup>6</sup> hgp100-specific CD226<sup>+</sup> or CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> *Pmel-1* T cells (in 200µl PBS) the next day. CD226<sup>+</sup> or CD226<sup>-</sup> *Pmel-1* T-cells were isolated by FACS from spleens from anti-CD137 mAbs treated mice as described above. 50µg of CpG 1826 (MWG Biotech) and 50µg of polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C), Invivogen) in 100 µl PBS were injected peritumorally 3, 6, and 9 days after adoptive *Pmel-1* T cell transfer and tumor growth and survival monitored.

### **Statistical Analysis**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 Software. Mann-Whitney U test or paired and unpaired student t test were used for single comparisons between two groups. For comparison of three or more groups, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, Holm-Sidak multiple test correction, or non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post-test were used. Differences in survival were evaluated with the Mantel-Cox test. P < 0.05 was considered statistically significant (P<0.05 = \*; P<0.01 = \*\*; P<0.001 = \*\*\*; P<0.0001 = \*\*\*\*).

## REFERENCES

- Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* *114*, 1537-1544.
- Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., Arnulf, B., Macro, M., Belhadj, K., Garderet, L., *et al.* (2017). Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med* *376*, 1311-1320.
- Bachmann, M.F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D.E., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* *7*, 549-557.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* *439*, 682-687.
- Bengsch, B., Ohtani, T., Khan, O., Setty, M., Manne, S., O'Brien, S., Gherardini, P.F., Herati, R.S., Huang, A.C., Chang, K.M., *et al.* (2018). Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity* *48*, 1029-1045 e1025.
- Bertrand, F., Montfort, A., Marcheteau, E., Imbert, C., Gilhodes, J., Filleron, T., Rochaix, P., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Meyer, N., *et al.* (2017). TNFalpha blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* *8*, 2256.
- Bianchi, E., Denti, S., Granata, A., Bossi, G., Geginat, J., Villa, A., Rogge, L., and Pardi, R. (2000). Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature* *404*, 617-621.
- Blackburn, S.D., Shin, H., Freeman, G.J., and Wherry, E.J. (2008). Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 15016-15021.
- Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* *10*, 29-37.
- Blake, S.J., Dougall, W.C., Miles, J.J., Teng, M.W., and Smyth, M.J. (2016a). Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* *22*, 5183-5188.
- Blake, S.J., Stannard, K., Liu, J., Allen, S., Yong, M.C., Mittal, D., Aguilera, A.R., Miles, J.J., Lutzky, V.P., de Andrade, L.F., *et al.* (2016b). Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov* *6*, 446-459.
- Buggert, M., Tauriainen, J., Yamamoto, T., Frederiksen, J., Ivarsson, M.A., Michaelsson, J., Lund, O., Hejdeman, B., Jansson, M., Sonnerborg, A., *et al.* (2014). T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS Pathog* *10*, e1004251.
- Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M., and Smyth, M.J. (2014a). The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol* *15*, 431-438.

- Chan, C.J., Smyth, M.J., and Martinet, L. (2014b). Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ* 21, 5-14.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227-242.
- Chesi, M., Robbiani, D.F., Sebag, M., Chng, W.J., Affer, M., Tiedemann, R., Valdez, R., Palmer, S.E., Haas, S.S., Stewart, A.K., *et al.* (2008). AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell* 13, 167-180.
- Curran, M.A., Geiger, T.L., Montalvo, W., Kim, M., Reiner, S.L., Al-Shamkhani, A., Sun, J.C., and Allison, J.P. (2013). Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. *J Exp Med* 210, 743-755.
- Danisch, S., Qiu, Q., Seth, S., Ravens, I., Dorsch, M., Shibuya, A., Shibuya, K., Forster, R., and Bernhardt, G. (2013). CD226 interaction with CD155 impacts on retention and negative selection of CD8 positive thymocytes as well as T cell differentiation to follicular helper cells in Peyer's Patches. *Immunobiology* 218, 152-158.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.
- Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619-624.
- Fung-Leung, W.P., Schilham, M.W., Rahemtulla, A., Kundig, T.M., Vollenweider, M., Potter, J., van Ewijk, W., and Mak, T.W. (1991). CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 65, 443-449.
- Gaud, G., Roncagalli, R., Chaoui, K., Bernard, I., Familiades, J., Colacios, C., Kassem, S., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., de Peredo, A.G., *et al.* (2018). The costimulatory molecule CD226 signals through VAV1 to amplify TCR signals and promote IL-17 production by CD4(+) T cells. *Sci Signal* 11.
- Gilfillan, S., Chan, C.J., Cella, M., Haynes, N.M., Rapaport, A.S., Boles, K.S., Andrews, D.M., Smyth, M.J., and Colonna, M. (2008). DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med* 205, 2965-2973.
- Girard-Gagnepain, A., Amirache, F., Costa, C., Levy, C., Frecha, C., Fusil, F., Negre, D., Lavillette, D., Cosset, F.L., and Verhoeven, E. (2014). Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood* 124, 1221-1231.
- Glodde, N., Bald, T., van den Boorn-Konijnenberg, D., Nakamura, K., O'Donnell, J.S., Szczepanski, S., Brandes, M., Eickhoff, S., Das, I., Shridhar, N., *et al.* (2017). Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity* 47, 789-802 e789.
- Guillerey, C., Ferrari de Andrade, L., Vuckovic, S., Miles, K., Ngiew, S.F., Yong, M.C., Teng, M.W., Colonna, M., Ritchie, D.S., Chesi, M., *et al.* (2015). Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent. *J Clin Invest* 125, 2077-2089.

Guillerey, C., Harjunpaa, H., Carrie, N., Kassem, S., Teo, T., Miles, K., Krumeich, S., Weulersse, M., Cuisinier, M., Stannard, K., *et al.* (2018). TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8(+) T cell immunity against multiple myeloma. *Blood*.

Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.

Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I., and Vale, R.D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 355, 1428-1433.

Iguchi-Manaka, A., Kai, H., Yamashita, Y., Shibata, K., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Yasui, T., Kikutani, H., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2008). Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Med* 205, 2959-2964.

Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., *et al.* (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6, 1236-1244.

Johnston, R.J., Comps-Agrar, L., Hackney, J., Yu, X., Huseni, M., Yang, Y., Park, S., Javinal, V., Chiu, H., Irving, B., *et al.* (2014). The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8(+) T Cell Effector Function. *Cancer Cell* 26, 923-937.

Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 12, 749-761.

Kamphorst, A.O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D.L., Konieczny, B.T., Daugherty, C.Z., Koenig, L., Yu, K., *et al.* (2017). Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 355, 1423-1427.

Kamran, N., Takai, Y., Miyoshi, J., Biswas, S.K., Wong, J.S., and Gasser, S. (2013). Toll-like receptor ligands induce expression of the costimulatory molecule CD155 on antigen-presenting cells. *PLoS One* 8, e54406.

Koyama, M., Kuns, R.D., Olver, S.D., Lineburg, K.E., Lor, M., Teal, B.E., Raffelt, N.C., Leveque, L., Chan, C.J., Robb, R.J., *et al.* (2013). Promoting regulation via the inhibition of DNAM-1 after transplantation. *Blood* 121, 3511-3520.

Kurtulus, S., Sakuishi, K., Ngiow, S.F., Joller, N., Tan, D.J., Teng, M.W., Smyth, M.J., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2015). TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest* 125, 4053-4062.

Landsberg, J., Kohlmeyer, J., Renn, M., Bald, T., Rogava, M., Cron, M., Fatho, M., Lennerz, V., Wolfel, T., Holzfel, M., and Tuting, T. (2012). Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 490, 412-416.

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., *et al.* (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 373, 23-34.

Lee, S.H., Toth, Z., Wong, L.Y., Brulois, K., Nguyen, J., Lee, J.Y., Zandi, E., and Jung, J.U. (2012). Novel Phosphorylations of IKKgamma/NEMO. *MBio* 3, e00411-00412.

Levy, C., Amirache, F., Girard-Gagnepain, A., Frecha, C., Roman-Rodriguez, F.J., Bernadin, O., Costa, C., Negre, D., Gutierrez-Guerrero, A., Vranckx, L.S., *et al.* (2017). Measles virus envelope



pseudotyped lentiviral vectors transduce quiescent human HSCs at an efficiency without precedent. *Blood Adv* 1, 2088-2104.

Li, J., He, Y., Hao, J., Ni, L., and Dong, C. (2018a). High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8(+) T Cells. *Front Immunol* 9, 2981.

Li, X.Y., Das, I., Lepletier, A., Addala, V., Bald, T., Stannard, K., Barkauskas, D., Liu, J., Aguilera, A.R., Takeda, K., *et al.* (2018b). CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. *J Clin Invest* 128, 2613-2625.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923-930.

Love, M.I., Anders, S., Kim, V., and Huber, W. (2015). RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Res* 4, 1070.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.

Lozano, E., Dominguez-Villar, M., Kuchroo, V., and Hafler, D.A. (2012). The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol* 188, 3869-3875.

Lozano, E., Joller, N., Cao, Y., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2013). The CD226/CD155 interaction regulates the proinflammatory (Th1/Th17)/anti-inflammatory (Th2) balance in humans. *Journal of immunology* 191, 3673-3680.

Maiti, A.K., Kim-Howard, X., Viswanathan, P., Guillen, L., Qian, X., Rojas-Villarraga, A., Sun, C., Canas, C., Tobon, G.J., Matsuda, K., *et al.* (2010). Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatology* 49, 1239-1244.

Martinet, L., and Smyth, M.J. (2015a). Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nature reviews. Immunology* 15, 243-254.

Martinet, L., and Smyth, M.J. (2015b). Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol* 15, 243-254.

Nakamura, K., Kassem, S., Cleynen, A., Chretien, M.L., Guillerey, C., Putz, E.M., Bald, T., Forster, I., Vuckovic, S., Hill, G.R., *et al.* (2018). Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. *Cancer Cell* 33, 634-648 e635.

Overwijk, W.W., Theoret, M.R., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., de Jong, L.A., Vyth-Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., Antony, P.A., Spiess, P.J., Palmer, D.C., *et al.* (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 198, 569-580.

Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., and Wherry, E.J. (2012). Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* 338, 1220-1225.

Pauken, K.E., Sammons, M.A., Odorizzi, P.M., Manne, S., Godec, J., Khan, O., Drake, A.M., Chen, Z., Sen, D.R., Kurachi, M., *et al.* (2016). Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* 354, 1160-1165.

Perez, O.D., Mitchell, D., Jager, G.C., South, S., Murriel, C., McBride, J., Herzenberg, L.A., Kinoshita, S., and Nolan, G.P. (2003). Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat Immunol* 4, 1083-1092.

Petit, A.E., Demotte, N., Scheid, B., Wildmann, C., Bigirimana, R., Gordon-Alonso, M., Carrasco, J., Valitutti, S., Godelaine, D., and van der Bruggen, P. (2016). A major secretory defect of tumour-infiltrating T lymphocytes due to galectin impairing LFA-1-mediated synapse completion. *Nat Commun* 7, 12242.

Philip, M., Fairchild, L., Sun, L., Horste, E.L., Camara, S., Shakiba, M., Scott, A.C., Viale, A., Lauer, P., Merghoub, T., *et al.* (2017). Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* 545, 452-456.

Porgador, A., Feldman, M., and Eisenbach, L. (1989). H-2Kb transfection of B16 melanoma cells results in reduced tumourigenicity and metastatic competence. *J Immunogenet* 16, 291-303.

Qiu, Q., Ravens, I., Seth, S., Rathinasamy, A., Maier, M.K., Davalos-Miszlitz, A., Forster, R., and Bernhardt, G. (2010). CD155 is involved in negative selection and is required to retain terminally maturing CD8 T cells in thymus. *J Immunol* 184, 1681-1689.

Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., *et al.* (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348, 124-128.

Robert, C., Long, G.V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J.C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocha, E., *et al.* (2015). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 372, 320-330.

Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., M, D.J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.F., Testori, A., Grob, J.J., *et al.* (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 364, 2517-2526.

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348, 69-74.

Scott, A.C., Dundar, F., Zumbo, P., Chandran, S.S., Klebanoff, C.A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S., *et al.* (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* 571, 270-274.

Seth, S., Qiu, Q., Danisch, S., Maier, M.K., Braun, A., Ravens, I., Czeloth, N., Hyde, R., Dittrich-Breiholz, O., Forster, R., and Bernhardt, G. (2011). Intranodal interaction with dendritic cells dynamically regulates surface expression of the co-stimulatory receptor CD226 protein on murine T cells. *J Biol Chem* 286, 39153-39163.

Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4, 573-581.

Shibuya, K., Lanier, L.L., Phillips, J.H., Ochs, H.D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakauchi, H., and Shibuya, A. (1999). Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* 11, 615-623.

- Shibuya, K., Shirakawa, J., Kameyama, T., Honda, S., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Onodera, M., Sumida, T., Nakauchi, H., Miyoshi, H., and Shibuya, A. (2003). CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *J Exp Med* *198*, 1829-1839.
- Shirakawa, J., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2005). Requirement of the serine at residue 329 for lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226). *Int Immunol* *17*, 217-223.
- Shirakawa, J., Wang, Y., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2006). LFA-1-dependent lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226) in CD4+ T cell. *Int Immunol* *18*, 951-957.
- Song, G., Bae, S.C., Choi, S., Ji, J., and Lee, Y. (2012). Association between the CD226 rs763361 polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Lupus* *21*, 1522-1530.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15545-15550.
- Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Kai, H., Miyamoto, A., Morikawa, Y., Ohkochi, N., Honda, S., and Shibuya, A. (2006). Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood* *107*, 1491-1496.
- Thommen, D.S., Koelzer, V.H., Herzig, P., Roller, A., Trefny, M., Dimeloe, S., Kiialainen, A., Hanhart, J., Schill, C., Hess, C., *et al.* (2018). A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med* *24*, 994-1004.
- Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2018). T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* *33*, 547-562.
- Todd, J.A., Walker, N.M., Cooper, J.D., Smyth, D.J., Downes, K., Plagnol, V., Bailey, R., Nejentsev, S., Field, S.F., Payne, F., *et al.* (2007). Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* *39*, 857-864.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., *et al.* (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* *366*, 2443-2454.
- Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., *et al.* (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* *515*, 568-571.
- Varet, H., Brillet-Gueguen, L., Coppee, J.Y., and Dillies, M.A. (2016). SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLoS One* *11*, e0157022.
- von Scheidt, B., Leung, P.S., Yong, M.C., Zhang, Y., Towne, J.E., Smyth, M.J., and Teng, M.W. (2014). Combined anti-CD40 and anti-IL-23 monoclonal antibody therapy effectively suppresses tumor growth and metastases. *Cancer Res.*

Wang, B., Zhang, W., Jankovic, V., Golubov, J., Poon, P., Oswald, E.M., Gurer, C., Wei, J., Ramos, I., Wu, Q., *et al.* (2018). Combination cancer immunotherapy targeting PD-1 and GITR can rescue CD8(+) T cell dysfunction and maintain memory phenotype. *Sci Immunol* 3.

Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12, 492-499.

Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature reviews. Immunology* 15, 486-499.

Zhang, Z., Wu, N., Lu, Y., Davidson, D., Colonna, M., and Veillette, A. (2015). DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *J Exp Med* 212, 2165-2182.

Zhu, Y., Ju, S., Chen, E., Dai, S., Li, C., Morel, P., Liu, L., Zhang, X., and Lu, B. (2010). T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *J Immunol* 185, 3174-3183.

Zhu, Y., Paniccchia, A., Schulick, A.C., Chen, W., Koenig, M.R., Byers, J.T., Yao, S., Bevers, S., and Edil, B.H. (2016). Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J Exp Med* 213, 167-176.

## SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

### Figure S1, related to Figure 1. Human CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell phenotype and functions.

**(A)** Representative FACS Plots showing the expression of the indicated markers on CD226<sup>-</sup> (blue) and CD226<sup>+</sup> (red) CD8<sup>+</sup> T cells from healthy donor peripheral blood cells. From n = 20 HD. **(B)** Graphs showing the absence of correlation between the CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> percentage and age or gender of healthy donors, W= women, M= men. From n = 25 HD. **(C)** Graphs showing the concentration of the indicated chemokines produced by purified CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells stimulated for 48hrs with  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28 microbeads. Mean  $\pm$  SD from triplicate wells, representative experiments of n=5 HD. **(D)** Graphs showing the expression of CD107a, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells after 6hrs of stimulation in presence of Fc $\gamma$ R<sup>+</sup> P815 cell line coated with increasing concentrations of anti-CD3 mAbs (clone OKT3). From n = 3-5 HD. **(E)** Graphs showing the concentration of the indicated cytokines produced by purified CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells stimulated for 48hrs with PMA and ionomycin. Mean  $\pm$  SD from triplicate wells, representative experiments of n = 5 HD. **(F)** Representative FACS plots showing the intracellular production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells activated by PMA (50ng/ml) and ionomycin (1 $\mu$ g/ml). From n = 3 HD. **(G)** Representative histograms showing the expression of phosphorylated (p) SLP76 by purified CD226<sup>-</sup> or CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells stimulated with  $\alpha$ -CD3 (OKT3, 10 $\mu$ g/ml) for 0, 1 or 5 minutes. From n = 5 HD. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing an individual HD. Correlations were assessed using a Spearman correlation test **(B)**. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA followed by unpaired T test with Holm-Sidak correction **(D)**. Statistical differences between two groups were determined using unpaired T test **(B, C, E)**. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

### Figure S2 related to Figure 2: Transcriptional profile of CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells.

**(A-C)** A global transcriptomic analysis of freshly isolated CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tn, Tcm and Temra cells from healthy donors was performed by RNA sequencing. **(A)** PCA analysis showing similar gene expression profiles between CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> in resting Tn, Tcm and Temra samples. **(B)** Volcano plots showing differentially expressed genes between CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> cells among Tn, Tcm and Temra CD8<sup>+</sup> T cells (*Adj*p<0.01, FC> 2). **(C)** Heat maps of selected genes related to transcription factors, cell cycle, cytokines and immune receptors differentially expressed (*Adj*p <0.01, FC > 2) between activated CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tem cells.

**Figure S3 related to Figure 3. Mechanisms of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell TCR defects.**

**(A)** CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were transduced with GFP control or CD226-GFP measles virus glycoprotein-displaying LVs (H/F-LVs) for 48hrs. FACS plots showing the expression of GFP, CD107a, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> cells stimulated for 6 hrs with  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28. Representative experiment from n = 2. **(B)** Representative FACS plot and graph recapitulating the percentages of CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells expressing LFA-1 open conformation after 2hrs in the presence of TCR/MHC-I cross-linker (CytoStim<sup>TM</sup>) or PMA (50ng/ml) and ionomycin (1 $\mu$ g/ml). From n = 3 HD. **(C)** Graph recapitulating the proliferation of purified CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells activated by  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28 microbeads for 5 days in the presence of the indicated blocking mAbs or control IgG (10  $\mu$ g/ml). **(D)** Graphs showing the IFN- $\gamma$  concentration in the corresponding culture supernatants after 48 hrs. Mean  $\pm$  SD from triplicate wells of a representative donor. n.d : not detectable. **(E)** Graph showing the normalized mRNA counts for the indicated transcripts in purified CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells activated (right) or not (left) detected by RNA sequencing as depicted in Figure 2. From n = 4-6 HD. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing an individual HD. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's correction (**C, D, E**). Statistical differences between two groups were determined using unpaired T test (**B**). n.s p>0.05, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

**Figure S4, related to Figure 4. Dysfunctional CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell accumulate in cancer patients.**

**(A)** Table showing the clinical features of IFM 2009 myeloma patients involved in this study. **(B)** Representative FACS plots and graph showing CD8<sup>+</sup> T cell percentages in the bone marrow (BM) of newly diagnosed multiple myeloma patients (MM; n = 177) and healthy donors (HD; n = 20). **(C)** Representative FACS histograms and graph showing the percentage of CD226<sup>-</sup> cells among CD8<sup>+</sup> T cells isolated from the BM of HD and MM patients. **(D)** Graph showing the correlation between the percentage of CD8<sup>+</sup> TILs and their expression of CD226 in MM patients (n = 177). **(E)** Heatmap showing the correlations between CD226 and the indicated cytotoxic lymphocyte specific genes within BM aspirates from MM patients analyzed by RNA sequencing (**GSE63473**). **(F-G)** MM patient CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> BM CD8<sup>+</sup> TILs were FACS purified and stimulated with  $\alpha$ -CD2/CD3/CD28 microbeads. **(F)** Representative histograms showing the proliferation of purified CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs after 5 days. From n = 5 MM patients. **(G)** Graph showing the concentration of the indicated cytokines in the culture supernatants after 48 hrs. Mean  $\pm$  SEM from n = 12 MM patients. **(H)** Graphs showing the percentage of HLA-A\*02-NYESO1 specific CD8<sup>+</sup>

TILs among HLA-A\*02<sup>+</sup> MM patients with detectable HLA-A\*02-NYESO1-PE multimers staining (**left**) and their CD226<sup>-</sup> frequency (**right**).

**(I)** Breast cancer patient disease free (DFS) and overall survival (OS) correlate with CD226 expression. Graphs showing the *p* value according to the selected CD226 cutoff for Kaplan–Meier disease-free (left) and overall (right) survival estimates. RNA sequencing data from 1006 invasive breast Cancer (BRCA) patients from the TCGA database were analyzed. Correlations were assessed using a Spearman correlation test (**D, E**). Statistical differences between two groups were performed using a Mann Whitney U test (**B,C**) or Wilcoxon matched-pairs signed rank test (**G**). \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001.

**Figure S5, related to Figure 5: Dysfunctional CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells accumulate upon tumor development.**

**(A)** Representative FACS plots showing the gating strategy used to identify naïve, effector memory and central memory compartments (Tn: CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>+</sup>, Tcm:CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>+</sup> Tem:CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>) CD8<sup>+</sup> TILs isolated from B16F10 bearing mice. **(B)** Graph recapitulating B16F10 tumor volumes and the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TILs 13 and 19 days after B16F10 injection. *n* = 9 -20 mice/group pooled from 4 independent experiments. **(C)** Representative FACS histograms and graph showing the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tems in the BM of WT mice 0, 14, 21 and 35 days after VK12653 myeloma cell injection. *n* = 18-30 mice per group pooled from 4 independent experiments. **(D)** Graph showing the correlation between the percentages of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TILs and tumor volumes in WT mice injected with B16F10. *n* = 37 mice. **(E)** Graph showing the Spearman correlation between the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tems and tumor growth in the BM of WT mice injected with VK12653 myeloma cells. *n* = 35 mice. **(F-G)** 10<sup>6</sup> ova-specific CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> naïve T cells were isolated from the spleen of OT-1 mice and injected i.v into *Rag2*<sup>-/-</sup> *gc*<sup>-/-</sup> **(F)** or *Cd8a*<sup>-/-</sup> mice **(G)** bearing B16F10 or B16F10-ova tumors. **(F)** Representative FACS plots showing the presence of intratumor OT-1 CD8<sup>+</sup> Tem cells 7 days post transfer into B16F10 or B16F10-ova bearing *Rag2*<sup>-/-</sup> *gc*<sup>-/-</sup> mice. Pooled data from 2 experiments. **(G)** Representative FACS plots and histogram showing the presence of intratumor OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells and their CD226 expression 7 days post transfer into *Cd8a*<sup>-/-</sup> mice. Pooled data from 3 experiments. Data are presented as mean ± SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's correction (**C**) and differences between two groups were assessed using a Mann Whitney (**B**). Correlations were assessed using a Spearman correlation test (**D-E**). \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001.

**Figure S6 related to Figure 6. Immune checkpoint blockade efficacy relies on CD226**

**(A)** Representative FACS plot and graph showing similar PD-1 expression among CD226<sup>+</sup> and CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TILs isolated from human breast cancer. n = 10 patients. **(B)** Graphs showing the percentage of B16K1 infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells and proliferating Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems in Ig control (clg) or anti-PD-1 treated mice. From n=10-12 mice/group pooled from 3 independent experiments. **(C)** Groups of C57BL/6 wild type (WT) and *Cd226*<sup>-/-</sup> mice (n = 10-12 mice/group) were injected s.c. with 1 x 10<sup>5</sup> MC38 colon adenocarcinoma cells. Mice were treated on days 10, 14, 18 and 22 (relative to tumor inoculation) with clg (350µg i.p.) or anti-PD-1 (250µg i.p., RMP1-14) and anti-CTLA4 (100µg i.p., 9D9 IgG2a, BMS), as indicated. Tumor area (mm<sup>2</sup>) was measured every 2-4 days. Data are presented as mean ± SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis **(C)** and differences between two groups were assessed using paired T test **(A)** or Mann-Whitney **(B)**. \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure S7 related to Figure 7: Tumor induced CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells accumulation depends on Eomes expression.**

**(A-G)** CD4<sup>cre</sup>xEomes<sup>fl/fl</sup> (Eomes<sup>KO</sup>) and CD4<sup>WT</sup>xEomes<sup>fl/fl</sup> (Eomes<sup>WT</sup>) mice WT mice were injected with B16F10 **(A-C)** or VK12653 **(D-G)** cell lines. **(A)** Graph showing the tumor growth of B16F10 in Eomes<sup>KO</sup> and Eomes<sup>WT</sup> mice. **(B-C)** Representative FACS plots showing TIL gating strategy **(B)** and graphs **(C)** recapitulating the percentages of total CD8<sup>+</sup> T cells and Tems (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>) from tumor lesions of Eomes<sup>KO</sup> and Eomes<sup>WT</sup> tumor bearing mice. **(D)** Representative FACS plots (left) and graph (right) recapitulating the percentage of CD155<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> malignant PC in the BM of MM bearing Eomes<sup>KO</sup> and Eomes<sup>WT</sup> mice. **(E-F)** Representative FACS plots showing gating strategy **(E)** and graphs recapitulating **(F)** the percentages of CD8<sup>+</sup> T cells and Tem CD8<sup>+</sup> from the BM of MM bearing Eomes<sup>KO</sup> and Eomes<sup>WT</sup> mice. **(G)** Representative FACS plots and graphs showing Eomes and CD226 expression by CD8<sup>+</sup> Tems in the BM of MM bearing Eomes<sup>KO</sup> and Eomes<sup>WT</sup> mice. Data pooled from 2 independent experiments n = 14 mice/group. Data are presented as mean ± SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between two groups were assessed using Mann Whitney test **(C, D, F and G)**. \*\*\*p<0.001.



**Figure S8 related to Figure 7 and 8: Anti-CD137 mAb treatment induces CD226 loss**

**(A-C)** C57BL/6 mice were treated with control Ig (clg; 100 $\mu$ g, 2A3, twice a week) or anti-CD137 mAbs (1-100 $\mu$ g; 3H3, twice a week). **(A)** Graphs showing increased CD8<sup>+</sup> Tem frequencies in the spleen (SP, left) and inguinal lymph nodes (PLN, right) of anti-CD137 treated mice. n= 9 mice/group. **(B)** Representative FACS plots (left) of CD226 expression by CD8<sup>+</sup> T cells isolated from the bone marrow (BM), SP and PLN and histograms (right) showing the expression of CD226 among SP CD8<sup>+</sup> Tem, Tcm and Tn from anti-CD137 mAbs treated mice. **(C)** Graph showing the percentage of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tems isolated from the spleen of C57BL/6 mice treated with the indicated doses of anti-CD137 mAbs. **(D-E)** C57BL/6 WT mice were treated with clg or TNFR agonists mAbs: anti-OX40 (100 $\mu$ g; OX-86, twice a week), anti-GITR (100 $\mu$ g; DTA-1, twice a week) and anti-CD137 (100 $\mu$ g; 3H3, twice a week). Graphs showing the percentages of Eomes<sup>+</sup> **(D)** and CD226<sup>-</sup> **(E)** among SP CD8<sup>+</sup> Tems. n= 10 mice/group pooled from 2 independent experiments. **(F)** CD226<sup>+</sup> naive T cells were purified from WT mice and transferred into RAG2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> mice. Representative FACS plots (left) and graph (right) showing the percentage of CD44<sup>hi</sup> memory CD8<sup>+</sup> T cells and their expression of CD226 in the blood 7 days post transfer. n = 10 mice/group pooled from 2 independent experiments. **(G)** Representative FACS Plots and histograms showing the expansion of splenic CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Tems in OT-I mice treated with  $\alpha$ -CD137 mAbs as compared to clg. **(H)** Graph showing the CD226 mRNA relative expression determined by qRT-PCR in CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tems isolated from the spleen C57BL/6 mice treated with anti-CD137 mAbs. n = 3 mice, representative experiment out of 3. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple group were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis **(C-E)**. Statistical differences between two groups were assessed using Mann Whitney test **(A and H)**. \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

### III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les immunothérapies sont des traitements incontournables dans le traitement de nombreux cancers qui visent à mobiliser le système immunitaire du patient pour éradiquer les cellules tumorales. Contrairement aux thérapies ciblées dirigées directement contre les cellules cancéreuses, les immunothérapies actuelles ciblent principalement les récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques PD-1 et CTLA-4 afin de potentialiser leurs fonctions antitumorales. Bien que les immunothérapies conduisent à une prolongation de la vie de nombreux patients, notamment ceux atteints de mélanome et du cancer du poumon non à petites cellules, leurs effets ne sont favorables que pour un faible pourcentage d'entre eux et dans un nombre limité de cancers. Ainsi, il est nécessaire de poursuivre les recherches pour identifier de nouvelles cibles qui régulent les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup>. CD226 est un récepteur activateur impliqué dans les fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> et des cellules NK (A. Shibuya et al. 1996) ainsi que dans la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en LT<sub>TH1</sub> CD4<sup>+</sup> et des LT<sub>TH17</sub> CD4<sup>+</sup> (Dardalhon et al. 2005; Gaud et al. 2018; Lozano et al. 2013). De nombreux travaux ont ainsi suggéré au travers de l'utilisation de modèles murins CD226<sup>-/-</sup> que CD226 joue un rôle majeur dans l'éradication des cellules tumorales exprimant ses ligand CD112 et CD155 (Gilfillan et al. 2008; Guillerey et al. 2015; Iguchi-Manaka et al. 2008; Tahara-Hanaoka et al. 2006) et qu'il favorise le développement de maladies auto-immunes (Dardalhon et al. 2005; Gaud et al. 2018; Lozano et al. 2013). Dans une approche visant à élaborer de nouvelles immunothérapies antitumorales, nous avons donc voulu caractériser davantage la distribution de l'expression de CD226 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> et caractériser ses propriétés immunorégulatrices. Nos expériences réalisées à la fois sur des LT CD8<sup>+</sup> issus du sang périphérique d'individus sains et sur des LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs chez des patients atteints de cancer indiquent que l'absence de CD226 est un mécanisme majeur de l'hyporéponse des LT CD8<sup>+</sup> à la stimulation du TCR qui limite leurs fonctions effectrices. Des modèles murins pré-cliniques nous ont permis de mettre en évidence que la progression tumorale conduit au développement de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> hypofonctionnels via le facteur de transcription Eomes. De façon importante, nos résultats indiquent que l'absence de CD226 à la surface de LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs identifie des LT CD8<sup>+</sup> qui ne répondent pas à l'immunothérapie anti-PD-1, ce qui suggère fortement que CD226 est un biomarqueur de réponses aux immunothérapies chez les patients atteints de cancer.

## A. Rôle de CD226 dans l'activation des LT CD8<sup>+</sup>

### 1. Le récepteur CD226 : marqueur phénotypique ou fonctionnel

Mon travail de thèse a initialement consisté à analyser la distribution de l'expression de CD226 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> dans le sang circulant d'individus sains. CD226 permet d'identifier deux populations distinctes de LT CD8<sup>+</sup> : les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>. Les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> expriment des niveaux similaires de nombreux marqueurs spécifiques des LT CD8<sup>+</sup> et sont distribués de façon homogène au sein des quatre sous-types de LT CD8<sup>+</sup> (LT<sub>N</sub> naïfs, LT<sub>CM</sub> centraux mémoires, LT<sub>EM</sub> effecteurs mémoires et LT<sub>EMRA</sub> effecteurs mémoires terminaux), ce qui indique que l'expression de CD226 n'est pas corrélée à un état de maturation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, l'analyse du répertoire TCRVβ des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> révèle que les deux populations sont caractérisées par une oligoclonalité similaire, suggérant ainsi que CD226 n'est pas associé à une différenciation lymphocytaire issue d'une stimulation par un antigène spécifique. L'analyse des profils transcriptomiques des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> au sein des LT<sub>N</sub>, LT<sub>CM</sub>, LT<sub>EM</sub> et LT<sub>EMRA</sub> confirme l'ensemble de ces résultats en indiquant que les deux populations possèdent des programmes cellulaires relativement identiques. Ainsi, nous avons fait l'hypothèse que CD226 est récepteur qui identifie deux populations de LT CD8<sup>+</sup> aux propriétés fonctionnelles différentes. L'analyse des capacités de prolifération et de sécrétion de cytokines effectrices a en effet permis de révéler que suite à la stimulation du TCR, les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> prolifèrent peu et sécrètent significativement moins de cytokines pro-inflammatoires par rapport aux LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>. Par ailleurs, nos expériences de lyse redirigée ont également révélé que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> ont des défauts de dégranulation de molécules lytiques vis-à-vis de cibles tumorales (lignée de mastocytomes P815). L'analyse des profils transcriptomiques des LTEM CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> a confirmé que CD226 joue un rôle important dans l'acquisition d'un programme fonctionnel résultant de l'activation du TCR. Bien que la stimulation du TCR induise une reprogrammation transcriptionnelle au sein des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>, elle conduit en effet à la surexpression de gènes impliqués dans la prolifération, le cycle cellulaire et la production de cytokines pro-inflammatoire au sein des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>.

La nécessité de CD226 dans le signal activateur issu de l'engagement du TCR a notamment été confirmé dans nos expériences de transduction lentivirales qui démontrent que l'expression forcée de CD226 restaure la sécrétion de cytokines effectrices par les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>. Ainsi, le deuxième objectif de ma thèse a consisté à caractériser davantage le rôle de CD226 dans la transduction du signal TCR des LT CD8<sup>+</sup>.

## 2. CD226 est nécessaire à la transduction du signal TCR des LT CD8<sup>+</sup>

CD226 contient dans sa partie cytoplasmique deux sites putatifs de phosphorylation impliqués dans la transduction du signal issu de son engagement, la sérine 329 (S329 chez l'Homme, S326 chez la souris) et la tyrosine 322 (Y322 chez l'Homme, Y319 chez la souris)(A. Shibuya, Lanier, and Phillips 1998). Bien qu'il ait été démontré que la phosphorylation de la sérine 329 par la PKC soit impliqué dans la liaison de CD226 à ses ligands exprimés par les cellules cibles (A. Shibuya, Lanier, and Phillips 1998), son rôle dans la transduction d'un signal activateur reste encore controversé (A. Shibuya, Lanier, and Phillips 1998; Z. Zhang et al. 2015). Conformément aux travaux initiaux ayant indiqué que la stimulation de CD226 conduit à la phosphorylation d'une tyrosine cytoplasmique (A. Shibuya et al. 1996), il a été démontré que la tyrosine cytoplasmique Y322 du motif consensus ITT-like YVNY est nécessaire à l'activation des fonctions cytolytiques des cellules NK dont CD226 est engagé (Z. Zhang et al. 2015). La tyrosine et l'asparagine du motif ITT-like YVNY sont deux acides aminés majeurs qui constituent un site d'ancrage de la sous-unité SH2 de la protéine adaptatrice Grb2. Grb2 recrute par la suite les protéines PI3K, Vav-1 et la PLC- $\gamma$  impliquées dans l'activation de Erk et d'Akt ainsi que dans l'augmentation du flux calcique intracellulaire (Z. Zhang et al. 2015). Une étude plus récente a par ailleurs confirmé que la costimulation de CD226 amplifie la transduction du signal TCR via l'association entre CD226 et Vav-1 au sein de LT CD4<sup>+</sup> activés (Gaud et al. 2018).

Au vu de nos résultats qui indiquent que les  $LT_{EM} CD8^+ CD226^-$  ont un défaut de phosphorylation de Erk et d'Akt ainsi qu'un faible signal calcique en réponse à la stimulation du TCR, CD226 semble donc jouer un rôle majeur dans l'optimisation de la transduction du signal TCR. Par ailleurs, la similitude du domaine cytoplasmique de CD226 et de celui de CD28 YMNM tend à confirmer que les protéines impliquées dans leurs voies de signalisation sont identiques. Ainsi, on suggère fortement qu'au sein des  $LT CD8^+$  activés par le TCR, CD226 costimule le signal TCR en augmentant l'activation de la PLC- $\gamma$  et de la PI3K à l'origine de l'activation des facteurs de transcription NFAT et NF $\kappa$ B. De façon similaire à CD28, on peut donc imaginer que CD226 diminue le seuil d'activation du TCR en régulant positivement la voie de signalisation de l'IL-2, à la fois en augmentant l'expression de CD25 et en augmentant la production d'IL-2. Cette hypothèse semble être confortée par nos résultats qui indiquent que les  $LT_{EM} CD8^+ CD226^-$  activés ont un défaut d'expression de CD25 (résultats non montrés) et qu'ils sécrètent très peu d'IL-2 à l'origine de leur faible prolifération. Tandis que CD28 est nécessaire à l'activation et l'expansion clonale des  $LT CD8^+$  naïfs (Acuto and Michel 2003), CD226 pourrait représenter le récepteur coactivateur majeur des  $LT CD8^+$  effecteurs nécessaire à leur activation par le TCR.

Les transductions de lymphocytes T avec des lentivirus codant pour la forme sauvage ou des formes mutées de CD226 (Y322F et S329F) réalisées au laboratoire nous permettront de caractériser davantage les rôles respectifs de la sérine 329 et de la tyrosine 322 de CD226 dans le signal TCR et les fonctions effectrices des LT. Par ailleurs, elles nous permettront d'évaluer par immunoprécipitation les différents partenaires protéiques de CD226 et si la sérine 329 et de la tyrosine 322 sont impliqués dans ces interactions.

De nombreux travaux ont indiqué que le signal TCR est amplifié et maintenu via la formation de microclusters membranaires comprenant de nombreuses protéines impliquées dans la transduction du signal dont ZAP-70, LAT et SLP-76 (Sherman et al. 2011). Il a notamment été observé que SLP-76 initialement situé en périphérie des microclusters de TCR s'associe à LAT via un mécanisme de polymérisation dynamique de l'actine afin de former des nanostructures nécessaires à l'activation des lymphocytes T par le TCR (Sherman et al. 2011). L'inhibition de la formation de ces nanostructures est en effet corrélée à une motilité réduite de SLP-76 et à une hyporéponse à la stimulation du TCR, conduisant à une diminution du flux calcique intracellulaire et à un défaut d'activation de NFAT (Bunnell et al. 2006; Sherman et al. 2011).

Au vu du rôle majeur du cytosquelette d'actine dans la formation d'une synapse immunologique mature (Dustin and Cooper 2000) et de son association avec CD226 au sein des LT stimulés par le TCR (Ralston et al. 2004), on peut suggérer que CD226 est une protéine adaptatrice impliquée dans la réorganisation spatiale des molécules de signalisation au niveau de la synapse des LT CD8<sup>+</sup>. Des travaux ont notamment suggéré que les protéines WASP et Nck liant le cytosquelette d'actine et SLP-76 en périphérie de la synapse jouent un rôle majeur dans les réactions de polymérisation-dépolymérisation de l'actine impliquées dans la relocalisation des protéines de la voie de signalisation du TCR (Barda-Saad et al. 2005). La localisation de LFA-1 en périphérie de la synapse immunologique (Grakoui et al. 1999) et son association avec CD226 dans les LT activés (K. Shibuya et al. 1999) tend à suggérer que de façon similaire à WASP, CD226 est impliqué dans le recrutement des protéines de signalisation situées en périphérie via la polymérisation de l'actine au niveau des microclusters de TCR plus centraux.

Ces hypothèses sont en accord avec une étude plus récente qui indique que des structures riches en intégrine situées en périphérie des microclusters de TCR sont nécessaires aux fonctions effectrices des lymphocytes T stimulés par le TCR (Hashimoto-Tane et al. 2016). Le défaut de phosphorylation de ZAP-70, LAT et SLP-76 au sein des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> activés par le TCR pourrait donc indiquer que CD226 recrute ces protéines au niveau du TCR afin de favoriser leur activation et transduire le signal.

### 3. CD226 est nécessaire au changement conformationnel de LFA-1

De façon importante, nos résultats indiquent que CD226 est impliqué dans la transduction du signal TCR « inside-out » qui conduit au changement conformationnel de LFA-1. Le changement conformationnel de LFA-1 augmente l'interaction de LFA-1 avec son ligand ICAM-1 exprimé par les cellules cibles afin de stabiliser les contacts intercellulaires et activer les LT CD8<sup>+</sup> (D. Li, Mollrem, and Ma 2009). Selon les travaux qui ont démontré que CD226 s'associe avec LFA-1 au sein des LT activés par le TCR (K. Shibuya et al. 1999) et que la stimulation conjointe du TCR et de LFA-1 conduit à la phosphorylation la tyrosine 322 de CD226 (K. Shibuya et al. 2003), on peut imaginer l'existence d'une boucle d'autorégulation positive entre CD226 et LFA-1.

On peut en effet supposer que (i) la stimulation du TCR phosphoryle la sérine 329 de CD226, (ii) la sérine 329 induit l'association physique de LFA-1 et CD226 et conduit à l'ouverture de LFA-1 (iii) l'interaction de LFA-1 avec son ligand induit la phosphorylation de la tyrosine 322 de CD226 impliquée dans les fonctions effectrices des LT stimulés par le TCR (K. Shibuya et al. 2003). CD226 permettrait donc d'augmenter les interactions entre LFA-1 et son ligand pour prolonger le temps de contact entre les LT CD8<sup>+</sup> et leurs cibles et former une synapse immunologique mature (K.-H. Lee 2002). Bien qu'une brève interaction puisse engendrer une activation du lymphocyte T, des contacts plus longs (environ 20 heures) sont associés à une diminution de leur motilité et à la production de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  (Mempel, Henrickson, and von Andrian 2004). On peut donc supposer que l'altération des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> résulte d'un défaut d'interaction des LT CD8<sup>+</sup> avec leur cible, défavorable à la transduction optimale des signaux activateurs issus de l'engagement du TCR. De façon complémentaire aux études préalables ayant démontré que l'engagement de LFA-1 est nécessaire à la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> activés par le TCR (K. Shibuya et al. 2003), nos résultats indiquent que l'engagement de LFA-1 est nécessaire à la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>. Ainsi, au-delà de favoriser la formation d'une synapse immunologique mature, CD226 serait donc nécessaire au signal activateur résultant de l'engagement de LFA-1 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> activés. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que LFA-1 est une molécule d'adhésion dont l'engagement transduit un signal « outside-in » nécessaire à l'activation de nombreuses kinases de la voie du TCR (D. Li, Mollidrem, and Ma 2009; H.-T. Ni, Deeths, and Mescher 2001; Perez et al. 2003).

De façon intéressante, une étude a révélé récemment que la protéine WASP est nécessaire à la réorganisation spatiale de microclusters de LFA-1 à la synapse immunologique et aux fonctions lytiques des LT CD8<sup>+</sup> (Houmadi et al. 2018). Ainsi, si l'on imagine que CD226 et WASP possèdent des fonctions similaires, le récepteur CD226 serait initialement impliqué dans la structuration de nanoclusters de LFA-1 au niveau de la synapse immunologique, puis dans son changement conformationnel et enfin dans la transduction du signal activateur résultant de son engagement.

#### 4. CD226 pourrait agir indépendamment de ses ligands

Le rôle de CD226 dans les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> a été essentiellement investigué *in vitro* et *in vivo* au travers d'expériences réalisées avec des anticorps monoclonaux ou des cellules cibles exprimant les ligands de CD226, CD112 et CD155 (Gilfillan et al. 2008; Iguchi-Manaka et al. 2008; A. Shibuya et al. 1996). Cependant, nos travaux semblent indiquer que CD226 est nécessaire à l'activation du TCR indépendamment de son interaction avec ses ligands. En effet, la majorité de nos tests fonctionnels réalisés sur les LT CD8<sup>+</sup> issus du sang périphérique de donneurs sains ont été réalisés en stimulant le TCR au moyen d'anticorps anti-CD3 ou par des billes couplées aux anticorps anti-CD2/CD3/CD28. Nos analyses phénotypiques ont par ailleurs indiqué que CD112 et CD155 ne sont pas détectables à la surface des LT CD8<sup>+</sup> activés par le TCR, aussi bien à 12h, 24h ou 48h après la stimulation (résultats non montrés). De plus, stimulation des LT CD8<sup>+</sup> en présence d'anticorps bloquant CD112 et CD155 n'altère pas les capacités des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> à sécréter de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ . Ainsi, l'activation de CD226 ne semble pas dépendre de l'interaction avec ses ligands.

Plusieurs études ont révélé que des récepteurs transmembranaires peuvent s'activer indépendamment de l'interaction avec leurs ligands, notamment certains récepteurs aux chimiokines (Dinkel et al. 2018) et des récepteurs impliqués dans l'activation des lymphocytes T (Steinbuck and Winandy 2018; Wan et al. 2018). L'ensemble de ces travaux indiquent notamment que la stimulation des lymphocytes T par le TCR induit la clusterisation des récepteurs au sein de complexes protéiques qui favorise la transduction du signal. Puisque l'engagement de LFA-1 conduit à la phosphorylation de la tyrosine 322 de CD226 et à l'activation des fonctions effectrices des lymphocytes T indépendamment de la stimulation de CD226 (K. Shibuya et al. 1999, 2003), on peut imaginer que LFA-1 est une molécule d'adhésion qui favoriserait la clusterisation de CD226 à l'origine de la transduction du signal TCR. La capacité de CD226 à former des *cis*-dimères (Johnston et al. 2014) pourrait éventuellement conforter cette hypothèse. Aussi, l'éventuelle clusterisation de CD226 reliée au cytosquelette d'actine permettrait d'optimiser la formation des microclusters des protéines de signalisation du TCR au niveau de la synapse immunologique.



## B. Rôle de CD226 dans le microenvironnement tumoral

### 1. Le microenvironnement tumoral génère des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> hypofonctionnels

L'existence de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> aux propriétés effectrices défectueuses dans le sang circulant de donneur sains nous a conduits à évaluer si les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> sont également présents chez des patients atteints de cancer. Ainsi, le deuxième objectif de ma thèse a été d'identifier et de caractériser le phénotype et les fonctions des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> dans un contexte tumoral. Les échantillons de moelle osseuse de patients atteints de myélome multiple (MM) disponibles dans notre laboratoire ainsi que ceux issus de patients atteints de cancer solides délivrés par des équipes collaboratrices nous ont permis d'investiguer le phénotype et les propriétés fonctionnelles des LT CD8<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs. Nos travaux indiquent que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> présents dans la moelle osseuse des patients atteints de MM ainsi que dans les tumeurs de patients atteints de cancer de l'ovaire et du cancer du sein sont hyporépondeurs à une stimulation polyclonale du TCR ou en réponse à une stimulation antigénique spécifique. La plus forte proportion de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> au sein de la moelle de patients atteints de MM que dans la moelle osseuse d'individus sains suggère que la croissance tumorale pourrait favoriser le développement de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> hypofonctionnels. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons voulu évaluer s'il existe une corrélation entre les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et la présence de cellules tumorales dans des modèles murins pré-cliniques. Contrairement à l'Homme, tous les LT CD8<sup>+</sup> murins expriment constitutivement CD226 (S. Seth et al. 2009).

Des modèles expérimentaux de mélanome (B16F10) et de MM (Vk\*MyC) nous ont permis de mettre en évidence que l'injection de cellules tumorales chez des souris CD57BL/6 conduit à l'apparition progressive de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> effecteurs mémoires (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) principalement au site de la tumeur et dans les ganglions drainants. Les tests fonctionnels réalisés *in vitro* ont indiqué que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> infiltrant les tumeurs chez les souris porteuses de mélanome ont des capacités prolifératives plus faibles que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et qu'ils sécrètent significativement moins de cytokines effectrices en réponse à la stimulation du TCR.

L'apparition progressive des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> issus de la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène dans le modèle B16F10-Ova pourrait suggérer que des interactions directes entre les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> ou que des facteurs solubles immunosuppresseurs inhibent les fonctions cytotoxiques des T CD8<sup>+</sup> via la perte de l'expression de CD226. Selon des études récentes, on pourrait notamment supposer que l'interaction entre CD226 et son ligand CD155 exprimé par les cellules tumorales est à l'origine de la diminution de CD226 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> (X. Li et al. 2018). Bien que nous n'ayons pas réalisé d'analyses du transcriptome des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> dans les tumeurs, les LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> du sang périphérique d'individus sains surexpriment les gènes spécifiques de la voie du TGF-β. Le TGF-β est une cytokine principalement sécrétée par les cellules tumorales et les cellules stromales dont le rôle immunosuppresseur a notamment été démontré *in vivo* dans un modèle expérimental du cancer du côlon (MC38) (Giovanna et al. 2009). En effet, le TGF-β induit un défaut de phosphorylation de nombreuses kinases de la voie de signalisation du TCR à l'origine d'une diminution de la prolifération et des capacités sécrétrices des LT CD8<sup>+</sup> (Giovanna et al. 2009). Il a par ailleurs été révélé récemment que la combinaison du blocage de PD-1 et du TGF-β chez des souris porteuses de tumeurs (MC38) induit une augmentation de la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> effecteurs au site tumoral (Mariathasan et al. 2018). La production de TGF-β par les LTreg CD4<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs, à l'origine d'une diminution des propriétés effectrices des LT CD8<sup>+</sup> et d'une augmentation de la croissance tumorale (H. Wang, Franco, and Ho 2017), pourrait également être à l'origine de l'inhibition du récepteur activateur CD226. Ainsi, on pourrait imaginer que le TGF-β présent dans le microenvironnement tumoral soit impliqué dans la downmodulation de CD226. Nous avons d'ailleurs réalisé des tests fonctionnels *in vitro* sur des LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> purifiés issus du sang d'individus sains qui suggèrent que la stimulation des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> par le TCR en présence de TGF-β conduit à une perte progressive de CD226.

Bien que ces résultats soient en accord avec une étude indiquant que le TGF-β inhibe l'expression de CD226 corrélée à l'inhibition de la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> en effecteurs cytotoxiques (B. Jin et al. 1989), ils sont encore préliminaires et nécessitent de réitérer l'expérience pour être confirmés. Bien que le TGF-β soit potentiellement impliqué dans la downmodulation de CD226, on peut imaginer qu'il existe d'autres facteurs immunosuppresseurs impliqués dans ce mécanisme.

En effet, une étude a démontré *in vitro* dans des expériences de co-culture que la sécrétion d'IDO (Indoléamine 2,3-dioxygénase) et PGE2 (Prostaglandine E2) par des cellules de mélanome induisent une diminution de l'expression de récepteurs activateurs impliqués dans les fonctions cytotoxiques des cellules NK (Pietra et al. 2012).

En conclusion, nos résultats indiquent que les tumeurs favorisent l'accumulation de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> non répondeurs au TCR et suggèrent fortement que l'absence du récepteur activateur CD226 est un mécanisme biologique qui favoriserait l'échappement de la tumeur aux fonctions cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup>.

## 2. Mécanismes impliqués dans la downmodulation de CD226

### a) *Le facteur de transcription Eomes*

Afin de savoir quels pouvaient être les mécanismes impliqués dans la downmodulation de CD226, nous avons analysé les profils transcriptomiques des LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> purifiés issus des LT CD8<sup>+</sup> circulants de donneurs sains. Bien que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> non activés possèdent des profils transcriptomiques très similaires (76 gènes différentiellement exprimés entre les deux populations), le facteur de transcription Eomes est significativement plus transcrit par les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> que par les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>. L'augmentation de la transcription du gène codant pour Eomes est corrélée à une augmentation de l'expression de la forme protéique au sein des LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>, aussi bien chez les individus sains que dans des contextes tumoraux chez l'Homme (patients MM) et chez la souris (modèles de MM Vk\*Myd et de mélanome B16F10). Nous avons donc voulu investiguer le rôle d'Eomes dans la régulation de l'expression de CD226 dans les modèles B1610 et Vk\*Myd. Nous avons démontré au travers d'expériences réalisées sur des souris porteuses de tumeurs CD4<sup>cre</sup> x Eomes<sup>fl/fl</sup> (Eomes KO) que la génération des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> dépend de l'expression d'Eomes.

Bien qu'il ait été décrit qu'Eomes soit nécessaire à l'acquisition des propriétés effectrices des LT CD8<sup>+</sup> et à leur différenciation en cellules mémoires (Intlekofer et al. 2005; Pearce et al. 2004), sa surexpression conduit à l'uprégulation de gènes impliqués dans l'épuisement lymphocytaire et diminue les capacités des LT CD8<sup>+</sup> à contrôler la croissance tumorale *in vivo* (J. Li, He, et al. 2018; Sen et al. 2016).

Il en effet été indiqué qu'Eomes se lie aux séquences génomiques qui activent la transcription des gènes codant les récepteurs inhibiteurs PD-1 et Tim-3 dont l'accessibilité permanente est à l'origine du maintien de l'expression de PD-1 dans les LT CD8<sup>+</sup> épuisés (Sen et al. 2016). De nombreuses études réalisées à la fois chez la souris et chez l'Homme ont démontré que la coexpression d'Eomes et de PD-1 caractérise les LT CD8<sup>+</sup> les plus dysfonctionnels dans les infections virales chroniques et les cancers (Blackburn et al. 2009; Buggert et al. 2014; J. Li, He, et al. 2018; Paley et al. 2012; Song et al. 2014; E. J. Wherry et al. 2007). Bien qu'Eomes soit un facteur de transcription qui active l'expression des gènes, nos résultats tendent à supposer qu'Eomes réprime la transcription du gène CD226. On peut donc suggérer qu'au-delà d'induire un épuisement lymphocytaire via la surexpression de récepteurs inhibiteurs, Eomes est impliqué dans l'inhibition de l'expression du récepteur activateur CD226 afin de générer une sous-population de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> hautement hypofonctionnelle.

Cependant, d'autres facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de CD226. Des études récentes réalisées sur le modèle de mélanome B16F10 ont indiqué que l'IL-27 est une cytokine qui favorise l'épuisement lymphocytaire en augmentant l'expression des récepteurs inhibiteurs Tim-3, LAG-3 et TIGIT à la surface des LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux (Chihara, Madi, Kondo, Zhang, Acharya, Singer, Nyman, Marjanovic, Kowalczyk, Wang, et al. 2018). Bien qu'il ait été démontré dans le même modèle murin que le facteur de transcription NFIL3 résultant du signaling de l'IL-27 augmente l'expression de Tim-3 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> (C. Zhu et al. 2015), son rôle dans l'expression des autres récepteurs inhibiteurs reste à être confirmé. On pourrait cependant imaginer que de façon similaire à Eomes, NFIL3 puisse être impliqué dans l'uprégulation ou le maintien de l'expression de PD-1 et dans l'inhibition de l'expression de CD226.

b) *Le récepteur coactivateur CD137*

Conformément aux études ayant démontré dans des modèles murins de mélanome et de lymphome que la stimulation de CD137 augmente la cytotoxicité des LT CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur via un mécanisme impliquant Eomes (Curran et al. 2013; Song et al. 2014), nous avons donc suggéré l'existence d'un lien entre la voie de signalisation du CD137 et la downmodulation de CD226. Par ailleurs, la surexpression du gène CD137 par les LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> circulants de donneurs sains par rapport aux LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> peuvent éventuellement conforter cette hypothèse. Ainsi, nous avons démontré que l'injection d'un anticorps agoniste CD137 chez des souris C57BL/6 WT conduit au développement de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> mémoires dont l'accumulation au sein des organes lymphoïdes est proportionnelle à la dose de l'anticorps injectée. De façon similaire aux LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> hypofonctionnels au site de la tumeur, les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> des souris C57BL/6 WT injectées avec l'anticorps agoniste anti-CD137 ne prolifèrent pas et ne sécrètent quasiment pas de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation polyclonale par le TCR *in vitro*. Des modèles transgéniques OT-1 et Pmel nous ont également permis de révéler que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> générés en réponse à la stimulation du CD137 sont dépourvus de fonctions effectrices après avoir été activés par l'ovalbumine *in vitro* et qu'ils possèdent des propriétés antitumorales significativement plus faibles que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> *in vivo*. Nos résultats démontrent donc que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> hypofonctionnels sont générés à la fois dans un contexte tumoral et à la fois à la suite de la stimulation chronique du CD137 chez la souris. Au vu de l'expression du ligand de CD137 (CD137-L) par les cellules dendritiques (Shao and Schwarz 2011) et par de nombreuses lignées tumorales (Salih et al. 2000; Q. Wang et al. 2008), on peut donc suggérer que l'interaction directe entre CD137 et CD137-L soit impliquée dans la downmodulation de CD226 dans les phases précoces de la réponse immunitaire antitumorale ou dans les phases plus tardives au site de la tumeur, respectivement.

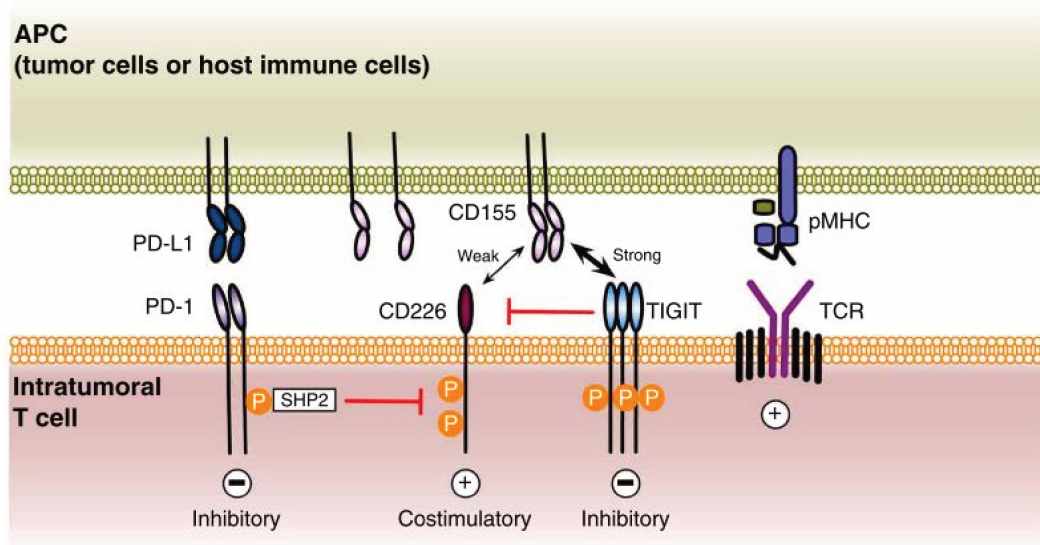
Bien qu'il ait été indiqué que CD137 identifie des LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux réactifs vis-à-vis de la tumeur chez des patients atteints du cancer de l'ovaire et du mélanome (Ye et al. 2014), des études alternatives ont également démontré que CD137 est fortement exprimé par les LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> les plus dysfonctionnels chez des patients atteints de mélanome et du cancer du poumon (Baitsch et al. 2011; Daniela S. Thommen et al. 2018).

Au vu de la littérature et de nos résultats, on peut donc imaginer que l'engagement du CD137 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> potentialise dans un premier temps leurs fonctions effectrices et favorise leur survie (Hernandez-chacon et al. 2012; Willoughby et al. 2014) mais que sa stimulation chronique conduise à l'inhibition de l'expression de CD226 et au développement de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> effecteurs mémoires aux propriétés antitumorales défectueuses. Puisque l'expression de CD137 résulte de l'activation lymphocytaire par le TCR, on peut imaginer que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> présents dans le sang des individus sains constituent des LT CD8<sup>+</sup> ayant été stimulés davantage que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>. Au vu du rôle de CD137 dans la potentialisation des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> et le maintien de leur survie (Ju et al. 2005; Melero et al. 1997), la forte expression de CD137 pourrait caractériser des LT CD8<sup>+</sup> mémoires ayant été stimulés de façon chronique qui perdent progressivement l'expression de CD226.

### C. CD226 comme biomarqueur de réponses aux immunothérapies

Les immunothérapies majoritairement basées sur le blocage du récepteur inhibiteur PD-1 sont actuellement utilisées dans le traitement de plusieurs cancers mais la réponse aux immunothérapies n'est pas durable et plusieurs patients y sont réfractaires. De nombreux travaux ont indiqué que la diversité phénotypique, fonctionnelle et génétique des LT CD8<sup>+</sup> dans les cancers conditionne l'état d'épuisement des LT CD8<sup>+</sup> et leurs réactivités vis-à-vis des immunothérapies (Bensch et al. 2018; Kurtulus et al. 2018; Daniela S. Thommen et al. 2018). Bien que la coexpression de plusieurs récepteurs inhibiteurs identifie des LT CD8<sup>+</sup> « épuisés » dans les cancers (Ahmadzadeh et al. 2009; Matsuzaki et al. 2010; D. S. Thommen et al. 2015), il a été indiqué qu'un niveau élevé de PD-1 (PD-1<sup>high</sup>) et l'expression du facteur de transcription TCF1 caractérisent les LT CD8<sup>+</sup> intratumoraux qui répondent aux immunothérapies anti-PD-1 (Kurtulus et al. 2018; Siddiqui et al. 2019; Daniela S. Thommen et al. 2018). Il a ainsi été révélé que la présence de LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> TCF1<sup>+</sup> est associée à un pronostic favorable chez les patients traités avec le Nivolumab (anti-PD-1) (Daniela S. Thommen et al. 2018).

Nos résultats indiquent que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> et CD226<sup>-</sup> infiltrant les tumeurs, aussi bien chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire que dans le modèle pré-clinique B16F10, expriment des niveaux similaires de récepteurs inhibiteurs. Cependant, les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> de la moelle osseuse de patients de MM expriment davantage TIGIT. Ainsi, on aurait pu imaginer que TIGIT puisse jouer un rôle majeur dans l'hypofonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>. Nous avons démontré *in vitro* que bloquer TIGIT via un anticorps monoclonal agoniste ne restaure ni la prolifération ni la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>, ce qui indique que seule l'absence du récepteur activateur CD226 est à l'origine des défauts fonctionnels des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>. Au vu des fonctions défectueuses des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et de leur forte expression du facteur de transcription Eomes impliqué dans l'épuisement lymphocytaire (A. C. Huang et al. 2017; J. Li, He, et al. 2018; Paley et al. 2012), nous avons supposé que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> ne répondent pas aux immunothérapies anti-PD-1. Ainsi, nous avons comparé les propriétés fonctionnelles des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> infiltrant la tumeur en réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 dans le modèle de mélanome B16K1. L'administration de l'anticorps antagoniste anti-PD-1 chez les souris porteuses de tumeurs ne conduit pas à l'augmentation des capacités prolifératives des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> aussi bien au site de la tumeur que dans la rate, contrairement aux LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>. Nos analyses *in vitro* ont indiqué que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> infiltrant les tumeurs ne répondent pas à l'anti-PD-1 puisque contrairement aux LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>, leur sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\alpha$  n'est pas augmentée en réponse à la stimulation du TCR. Nos collaborateurs ont par ailleurs démontré via des modèles de tumeur MC38 que l'absence de CD226 (souris CD226<sup>-/-</sup>) ou son blocage abroge la capacité des LT CD8<sup>+</sup> à contrôler la croissance tumorale, contrairement aux souris WT traitées avec l'anti-PD-1. Nos résultats confortent des travaux récents qui ont révélé dans le même modèle MC38 que la présence de CD226 est nécessaire aux effets synergiques du blocage de PD-1 et de l'activation du récepteur coactivateur GITR dans le rejet total et durable de la tumeur (B. Wang et al. 2018). La combinaison des anticorps monoclonaux anti-PD1 et anti-GITR favorise le développement de LT CD8<sup>+</sup> mémoires, diminue la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> dysfonctionnels coexprimant plusieurs récepteurs inhibiteurs (PD-1, LAG-3, Tim-3 et CD244) et augmente significativement l'expression de CD226 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur. Cette étude révèle que de façon similaire à CD28 (Hui et al. 2018), PD-1 déphosphoryle une tyrosine du domaine intracytoplasmique de CD226 via l'activité de la phosphatase SHP-2 (Figure 40).



**Figure 40 :** Modèle suggéré pour le rôle de PD-1 dans l'inhibition du signaling de CD226

From Wang, B. et al, *Combination cancer immunotherapy targeting PD-1 and GITR can rescue CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction and maintain memory phenotype* Science Immunology, 2018

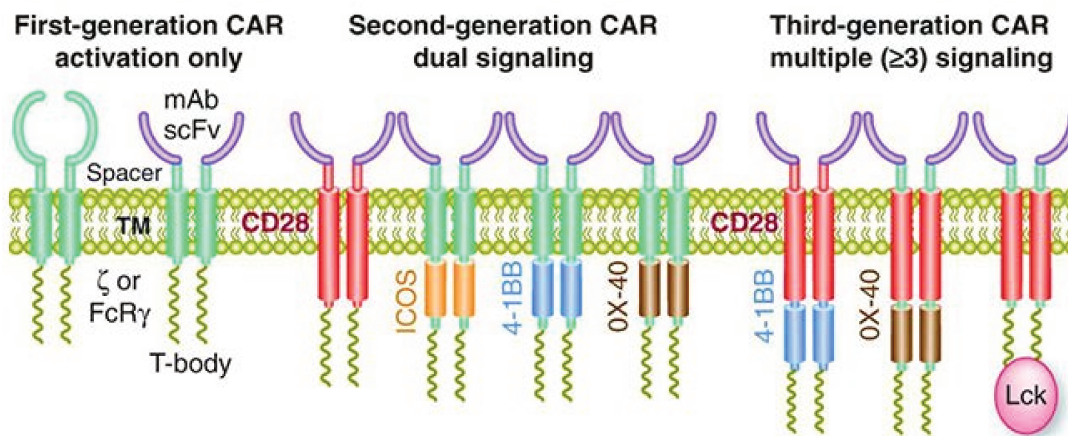
Il est donc fortement suggéré que la restauration de la phosphorylation de CD226 résultant de l'inhibition de PD-1 permet aux LT CD8<sup>+</sup> « épuisés » de réacquérir leurs fonctions effectrices antitumorales. La nécessité de CD226 dans l'efficacité des traitements anti-PD-1 et anti-GITR a été confirmé dans des modèles CD226 KO où il a été démontré que l'absence de CD226 inhibe la potentialisation des réponses cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> en réponse aux traitements et diminue rapidement la survie des souris malades (modèle MC38) (B. Wang et al. 2018). Ainsi, les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> infiltrant la tumeur semblent être des LT CD8<sup>+</sup> « partiellement épuisés » dont les fonctions effectrices peuvent être potentialisés par les anti-PD-1 tandis que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> seraient des LT CD8<sup>+</sup> « totalement épuisés » incapables de répondre aux immunothérapies antitumorales. L'absence de CD226 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> constituerait donc un marqueur supplémentaire associé à la perte progressive des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> épuisés dans les tumeurs. Il serait intéressant de mener des études rétrospectives chez des patients atteints de cancer afin d'évaluer une éventuelle corrélation entre l'issue clinique du patient et le ratio des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>/ LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> infiltrant la tumeur. Ces études nous permettront d'évaluer si CD226 constitue un biomarqueur servant d'outil pronostique pour prédire la réponse aux immunothérapies anti-PD-1 chez les patients atteints de cancer.



Plusieurs études ont révélé que la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> dans le sang périphérique et dans la tumeur de patients atteints de cancer solide ou hématopoïétique est associé à la progression tumorale (Strioga, Pasukoniene, and Characiejus 2011). Au vu des rôles similaires de CD28 et CD226, on peut donc supposer qu'une forte proportion de LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> pourrait favoriser la tumorigenèse et constituer un marqueur de mauvais pronostic.

De nombreux travaux ont révélé que l'efficacité des immunothérapies anti-PD-1 résulte de l'expansion d'une population lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> possédant des caractéristiques de cellules souches capables de s'auto-renouveler, caractérisée par l'expression du facteur de transcription TCF1 (Im et al. 2016; Utzschneider et al. 2016; T. Wu et al. 2016). Le modèle d'infection virale chronique (Clone 13 du LCMV) a mis en évidence que TCF1 est impliqué dans la génération de LT CD8<sup>+</sup> « progéniteurs » via l'expression du facteur de transcription Bcl6 (T. Wu et al. 2016) et qu'il est également associé à la localisation spécifique des LT CD8<sup>+</sup> dans les organes lymphoïdes secondaires via l'expression du récepteur CXCR5 (Im et al. 2016). Ainsi, il a été suggéré que cette localisation spécifique des LT CD8<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> préserve les capacités prolifératives et fonctionnelles des LT CD8<sup>+</sup> épuisés (He et al. 2016) qui sont alors capables de répondre aux immunothérapies anti-PD-1 (Im et al. 2016). De façon surprenante, nos analyses RNAseq sur les LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et CD226<sup>+</sup> issus des LT CD8<sup>+</sup> d'individus sains indiquent que TCF1, Bcl-6, CXCR5 sont davantage exprimés par les LT<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>. On peut donc imaginer que les rôles des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> intratumoraux diffèrent sensiblement des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> qui circulent dans le sang de donneurs sains. La plus forte expression de CXCR5 par les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> pourrait notamment indiquer que les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> possèdent des propriétés relativement similaires aux LT<sub>FH</sub> et pourraient aider à la mise en place d'une réponse immunitaire humorale. On pourrait aussi imaginer que dans des contextes physiologiques chez les individus sains, les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> seraient des LT CD8<sup>+</sup> aux propriétés d'auto-renouvellement pouvant constituer un « pool » de cellules mémoires localisés dans les OLS, capables de protéger l'individu contre les infections pathogéniques. Dans un contexte tumoral, la nécessité de la présence de CD226 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> dans la réponse aux immunothérapies pourrait conduire au développement de nouvelles stratégies immunothérapeutiques. La première serait de développer un anticorps agoniste anti-CD226 qui stimulerait les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> intratumoraux.

Si les expériences actuelles réalisées au laboratoire parviennent à confirmer le rôle de CD226 dans la transduction du signal TCR (notamment via la phosphorylation de la sérine329 et/ou de la tyrosine 322), la deuxième serait donc de générer des cellules CD8<sup>+</sup> CAR T (CAR T cells) chimériques dans lesquelles seraient greffés le domaine cytoplasmique de CD226. Les cellules CD8<sup>+</sup> CAR T sont des lymphocytes de patients que l'on modifie génétiquement *in vitro* pour augmenter la reconnaissance spécifique de la tumeur et potentialiser leurs fonctions antitumorales, ultérieurement réinjectés chez les patients. Les modifications génétiques consistent à modifier la partie extra-cellulaire du TCR qui reconnaît la tumeur ainsi que la partie intracellulaire que l'on greffe à plusieurs domaines de récepteurs activateurs des lymphocytes T. Il existe aujourd'hui plusieurs « génération » de cellules CAR T dont l'évolution est proportionnelle au nombre de domaines greffés au TCR (Figure 41). Les cellules CAR-T représentent un outil thérapeutique très prometteur dans le traitement contre le cancer. Cependant, aucun CAR-T n'a actuellement reçu d'autorisation de mise sur le marché européen.



**Figure 41 :** Les différentes générations de cellules CAR T

From Internet <http://www.association-saint-louis.org/car-t-cells-une-avancee-majeure-dans-limmunotherapie-des-leucemies>

## IV. BIBLIOGRAPHIE

- Acuto, O., & Michel, F. (2003). CD28-MEDIATED CO-STIMULATION : A QUANTITATIVE SUPPORT FOR TCR SIGNALLING. *Nature Reviews Immunology*, 3(December). <https://doi.org/10.1038/nri1248>
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerck, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8), 1537–1544. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>
- Albert, M. L., Sauter, B., & Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 392(6671), 86–89. <https://doi.org/10.1038/32183>
- Andarini, S., Kikuchi, T., Nukiwa, M., Pradono, P., Suzuki, T., Ohkouchi, S., ... Nukiwa, T. (2004). Adenovirus Vector-Mediated in Vivo Gene Transfer of OX40 Ligand to Tumor Cells Enhances Antitumor Immunity of Tumor-Bearing Hosts. *Cancer Research*, 64(9), 3281–3287. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3911>
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., ... Vivier, E. (2006). Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity*, 25(2), 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.013>
- Ansell, S. M., Geyer, S. M., Hurvitz, S., Fernando, D., Habermann, T. M., Inwards, D. J., ... Timmerman, J. (2006). Phase I/II Study of Ipilimumab (MDX-010), an Anti-CTLA-4 Monoclonal Antibody, in Patients with Follicular Non-Hodgkin Lymphoma. *Blood*, 108(11), 2729. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/108/11/2729>
- Ardolino, M., Zingoni, A., Cerboni, C., Cecere, F., Soriani, A., Iannitto, M. L., & Santoni, A. (2011). DNAM-1 ligand expression on Ag-stimulated T lymphocytes is mediated by ROS-dependent activation of DNA-damage response: Relevance for NK-T cell interaction. *Blood*, 117(18), 4778–4786. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-300954>
- Bachmann, M. F., Gallimore, A., Jones, E., Ecabert, B., Acha-orbea, H., & Kopf, M. (2001). Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA-4-deficient T cells : a paradigm reconsidered. *European Journal of Immunology*, 450–458.
- Bachmann, M. F., Köhler, G., Ecabert, B., Mak, W., Kopf, M., Bachmann, M. F., & Ko, G. (1999). Cutting Edge: Lymphoproliferative Disease in the Absence of CTLA-4 Is Not T Cell Autonomous. *The Journal of Immunology*.
- Bachmann, M. F., Mckall-faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D. E., ... Ohashi, P. S. (1997). Distinct Roles for LFA-1 and CD28 during Activation of Naive T Cells : Adhesion versus Costimulation. *Immunity*, 7, 549–557.
- Baekkevold, E. S., Yamanaka, T., Palframan, R. T., Carlsen, H. S., Reinholt, F. P., von Andrian, U. H., ... Haraldsen, G. (2001). The Ccr7 Ligand ELC (Ccl19) Is Transcytosed in High Endothelial Venules and Mediates T Cell Recruitment. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(9), 1105–1112. <https://doi.org/10.1084/jem.193.9.1105>
- Bai, X. F., Gao, J. X., Liu, J., Wen, J., Zheng, P., & Liu, Y. (2001). On the site and mode of antigen presentation for the initiation of clonal expansion of CD8 T cells specific for a natural tumor antigen. *Cancer Research*, 61(18), 6860–6867.

- Baitsch, L., Baumgaertner, P., Devèvre, E., Raghav, S. K., Legat, A., Barba, L., ... Speiser, D. E. (2011). Exhaustion of tumor-specific CD8 + T cells in metastases from melanoma patients Find the latest version : Exhaustion of tumor-specific CD8 + T cells in metastases from melanoma patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2350–2360. <https://doi.org/10.1172/JCI46102.2350>
- Bajénoff, M., Egen, J. G., Koo, L. Y., Laugier, J. P., Brau, F., Glaichenhaus, N., & Germain, R. N. (2006). Stromal Cell Networks Regulate Lymphocyte Entry, Migration, and Territoriality in Lymph Nodes. *Immunity*, 25(6), 989–1001. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.011>
- Banerjee, A., Gordon, S. M., Intlekofer, A. M., Paley, M. A., Mooney, E. C., Lindsten, T., ... Reiner, S. L. (2010). Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8 + T Cells To Compete for the Memory Cell Niche. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002042>
- Bansal-Pakala, P., Halteman, B. S., Cheng, M. H.-Y., & Croft, M. (2004). Costimulation of CD8 T Cell Responses by OX40. *The Journal of Immunology*, 172(8), 4821–4825. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.4821>
- Barber, D. F., Faure, M., & Long, E. O. (2004). LFA-1 Contributes an Early Signal for NK Cell Cytotoxicity. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3653>
- Barda-Saad, M., Braiman, A., Titerence, R., Bunnell, S. C., Barr, V. A., & Samelson, L. E. (2005). Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nature Immunology*, 6(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/ni1143>
- Barry, M., & Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*, 2(6), 401–409. <https://doi.org/10.1038/nri819>
- Beer, T. M., Kwon, E. D., Drake, C. G., Fizazi, K., Logothetis, C., Gravis, G., ... Gerritsen, W. (2016). Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Ipilimumab Versus Placebo in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Patients With Metastatic Chemotherapy-Naive Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35(1), 40–47. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.1584>
- Bengsch, B., Ohtani, T., Khan, O., Setty, M., Manne, S., O'Brien, S., ... Wherry, E. J. (2018). Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity*, 48(5), 1029–1045.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.026>
- Bennett, F., Luxenberg, D., Ling, V., Wang, I.-M., Marquette, K., Lowe, D., ... Carreno, B. M. (2003). Program Death-1 Engagement Upon TCR Activation Has Distinct Effects on Costimulation and Cytokine-Driven Proliferation: Attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, But Not CD28, IL-7, and IL-15 Responses. *The Journal of Immunology*, 170(2), 711–718. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.711>
- Bennett, S. R. M., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. A. P., & Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, 393(6684), 478–480. <https://doi.org/10.1038/30996>
- Bertrand, F., Rochotte, J., Colacios, C., Montfort, A., Tilkin-Mariamé, A. F., Touriol, C., ... Ségui, B. (2015). Blocking tumor necrosis factor  $\alpha$  enhances CD8 T-cell-dependent immunity in experimental melanoma. *Cancer Research*, 75(13), 2619–2628. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2524>
- Bertrand, F., Rochotte, J., Levade, T., & Segui, B. (2016). Targeting TNF alpha as a novel strategy to enhance CD8 C T cell-dependent immune response in melanoma ? *OncImmunology*, 5(1), 8–10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1068495>

- Bettini, M. L., Chou, P., Guy, C., Lee, T., Vignali, K. M., & Vignali, D. A. A. (2017). CD3 ITAM diversity is required for optimal T cell receptor signaling and thymocyte development. *The Journal of Immunology*, *199*(5), 1555–1560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700069>.CD3
- Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., & Frazer, I. H. (2017). Interferon- $\gamma$  derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Nature Publishing Group*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.67>
- Blackburn, S. D., Shin, H., Freeman, G. J., & Wherry, E. J. (2008). Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by  $\alpha$ PD-L1 blockade Shawn. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *2008*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.03.007>
- Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., ... Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, *10*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>
- Blake, S. J., Stannard, K., Liu, J., Allen, S., Yong, M. C. R., Mittal, D., ... Smyth, M. J. (2016). Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Discovery*, (April). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0944>
- Blank, C., Brown, I., Peterson, A. C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., & Gajewski, T. F. (2004). PD-L1 / B7H-1 Inhibits the Effector Phase of Tumor Rejection by T Cell Receptor (TCR) Transgenic CD8+ T Cells. *Cancer Research*, *64*(February), 1140–1145.
- Boise, L. H., Boise, L. H., Minn, A. J., Minn, A. J., Noel, P. J., Noel, P. J., ... Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*, *3*(1), 87–98. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90161-2](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90161-2)
- Boomer, J. S., & Green, J. M. (2010). An Enigmatic Tail of CD28 Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002436>
- Boon, T. (1996). Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, *12*(1), 337–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.12.1.337>
- Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., ... Zitvogel, L. (2004). NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood*, *104*(10), 3267–3275. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0380>
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., ... Moretta, A. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *The Journal of Experimental Medicine*, *198*(4), 557–567. <https://doi.org/10.1084/jem.20030788>
- Brahmer, J. R., Drake, C. G., Wollner, I., Powderly, J. D., Picus, J., Sharfman, W. H., ... Topalian, S. L. (2010). Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(19), 3167–3175. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.7609>
- Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., ... Dustin, M. L. (2001). The Immunological Synapse. *Annual Review of Immunology*, *19*(1), 375–396. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.375>
- Brooks, J., Fleischmann-mundt, B., Woller, N., Niemann, J., Ribback, S., Peters, K., ... Florian, K. (2018). Perioperative , Spatiotemporally Coordinated Activation of T and NK Cells Prevents Recurrence of Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, 475–489. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2415>

- Brown, J. A., Dorfman, D. M., Ma, F., Sullivan, E. L., Munoz, O., Wood, C. R., ... Freeman, G. J. (2003). Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1257>
- Brunner, M. C., Chambers, C. A., Ka-ming, F., Hanke, J., Winoto, A., Allison, J. P., ... Allison, J. P. (1999). CTLA-4-Mediated Inhibition of Early Events of T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology*.
- Bryceson, Y. T., Ljunggren, H., & Long, E. O. (2009). Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood*, *114*(13), 2657–2667. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-201632>.The
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Barber, D. F., Ljunggren, H.-G., & Long, E. O. (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *202*(7), 1001–1012. <https://doi.org/10.1084/jem.20051143>
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H., & Long, E. O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, *107*(1), 159–167. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1351>.Supported
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H., Long, E. O., & Dc, W. (2011). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, *107*(1), 159–166. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1351>
- Buggert, M., Tauriainen, J., Yamamoto, T., Frederiksen, J., Ivarsson, M. A., Michaëlsson, J., ... Karlsson, A. C. (2014). T-bet and Eomes Are Differentially Linked to the Exhausted Phenotype of CD8+ T Cells in HIV Infection. *PLoS Pathogens*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004251>
- Bunnell, S. C., Singer, A. L., Hong, D. I., Jacque, B. H., Jordan, M. S., Seminario, M.-C., ... Samelson, L. E. (2006). Persistence of Cooperatively Stabilized Signaling Clusters Drives T-Cell Activation. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(19), 7155–7166. <https://doi.org/10.1128/MCB.00507-06>
- Burns, G. F., Triglia, T., Werkmeister, J. A., Begley, C. G., & Boyd, A. W. (1985). TLISA1, A HUMAN T LINEAGE-SPECIFIC ACTIVATION ANTIGEN INVOLVED IN THE DIFFERENTIATION OF CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES AND ANOMALOUS KILLER CELLS FROM THEIR PRECURSORS. *The Journal of Experimental Medicine*, *161*(May).
- Bustelo, R. (2000). Regulatory and Signaling Properties of the Vav Family. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(5), 1461–1477.
- Calzascia, T., Mak, T. W., Ohashi, P. S., Calzascia, T., Pellegrini, M., Hall, H., ... Ohashi, P. S. (2007). TNF $\alpha$  is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(12), 3833–3845. <https://doi.org/10.1172/JCI32567>.)
- Carlsten, M., Bjo, N. K., Bryceson, Y., Hall, T. Van, Baumann, B. C., Hanson, M., ... Kiessling, R. (2007). DNAX Accessory Molecule-1 Mediated Recognition of Freshly Isolated Ovarian Carcinoma by Resting Natural Killer Cells. *Cancer Research*, (03), 1317–1326. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2264>
- Carlsten, M., Norell, H., Bryceson, Y. T., Poschke, I., Schedvins, K., Ljunggren, H.-G., ... Malmberg, K.-J. (2009). Primary Human Tumor Cells Expressing CD155 Impair Tumor Targeting by Down-Regulating DNAM-1 on NK Cells. *The Journal of Immunology*, *183*(8), 4921–4930. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901226>

- Carlsten, M., Norell, H., Bryceson, Y. T., Schedvins, K., Ljunggren, H., Carlsten, M., ... Schedvins, K. (2009). Primary Human Tumor Cells Expressing CD155 Impair Tumor Targeting by Down-Regulating DNAM-1 on NK Cells. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901226>
- Carrio, R., Bathe, O. F., & Malek, T. R. (2004). Initial Antigen Encounter Programs CD8 + T Cells Competent to Develop into Memory Cells That Are Activated in an Antigen-Free, IL-7- and IL-15-Rich Environment. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7315>
- Carter, L. L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Clive, R., ... Carreno, B. M. (2002). PD-1 : PD-L inhibitory pathway affects both CD4 + and CD8 + T cells and is overcome by IL-2. *European Journal of Immunology*, 32(4), 634–643.
- Castriconi, R., Dondero, A., Corrias, M. V., Lanino, E., Pende, D., Moretta, L., ... Moretta, A. (2004). Natural Killer Cell-Mediated Killing of Freshly Isolated Neuroblastoma Cells. *Cancer Research*, 64(24), 9180–9184. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2682>
- Castriconi, R., Dondero, A., Negri, F., Bellora, F., Nozza, P., Carnemolla, B., ... Bottino, C. (2007). Both CD133+ and CD133- medulloblastoma cell lines express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 37(11), 3190–3196. <https://doi.org/10.1002/eji.200737546>
- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in Immunology*, 9, 847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., & Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2), 747–752. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.747>
- Cepek, K. L., Parker, C. M., Madara, J. L., & Brenner, M. B. (1993). Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 150(8), 3459 LP-3470. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/150/8/3459.abstract>
- Chambers, C. A., Kuhns, M. S., Jackson, G., & Allison, J. P. (2001). CTLA-4-MEDIATED INHIBITION IN REGULATION OF T CELL RESPONSES : Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. *Annual Review of Immunology*.
- Chambers, C. A., Sullivan, T. J., & Allison, J. P. (1997). Lymphoproliferation in CTLA-4 – Deficient Mice Is Mediated by Costimulation-Dependent Activation of CD4+ T Cells. *Immunity*, 7, 885–895.
- Chambers, C. A., Sullivan, T. J., Truong, T., & Allison, J. P. (1998). Secondary but not primary T cell responses are enhanced in CTLA-4-deficient CD8+ T cells. *European Journal of Immunology*, 28(10), 3137–3143. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<3137::AID-IMMU3137>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3137::AID-IMMU3137>3.0.CO;2-X)
- Chan, C. J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M. T., Town, L., ... Smyth, M. J. (2014). The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nature Immunology*, 15(5), 431–438. <https://doi.org/10.1038/ni.2850>
- Chan, C. J., Smyth, M. J., & Martinet, L. (2014). Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death and Differentiation*, 21(1), 5–14. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.26>

- Chang, J. T., Palanivel, V. R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A. M., Banerjee, A., ... Reiner, S. L. (2007). Asymmetric T Lymphocyte Adaptive Immune Responses. *Science*, 315(March), 1687–1692.
- Chauvin, J.-M., Pagliano, O., Fourcade, J., Sun, Z., Wang, H., Sander, C., ... Zarour, H. M. (2015). TIGIT and PD-1 impair tumor antigen – specific CD8 + T cells in melanoma patients. *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 1–13. <https://doi.org/10.1172/JCI80445DS1>
- Chee, S. J., Lopez, M., Mellows, T., Gankande, S., Moutasim, K. A., Harris, S., ... Ottensmeier, C. H. (2017). Evaluating the effect of immune cells on the outcome of patients with mesothelioma. *British Journal of Cancer*, 117(9), 1341–1348. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.269>
- Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., & Riley, J. L. (2004). SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology*, 173(2), 945–954. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.945>
- Chen, S., Lee, L., Fisher, T. S., Jessen, B., Elliott, M., Evering, W., ... Lin, J. C. (2015). Combination of 4-1BB Agonist and PD-1 Antagonist Promotes Antitumor Effector / Memory CD8 T Cells in a Poorly Immunogenic Tumor Model. *Cancer Research*, 149–161. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0118>
- Chen, X., Bäuml, M., Männel, D. N., Zack, O. M., Oppenheim, J. J., Chen, X., ... Ma, D. N. (2007). Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4 + CD25 + T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.154>
- Chihara, N., Madi, A., Kondo, T., Zhang, H., Acharya, N., Singer, M., ... Ana, C. (2018). Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature*, 558(7710), 454–459. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0206-z>
- Chihara, N., Madi, A., Kondo, T., Zhang, H., Acharya, N., Singer, M., ... Kuchroo, V. K. (2018). Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature*, 558(7710), 454–459. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0206-z>
- Chikuma, S., Imboden, J. B., & Bluestone, J. A. (2003). Negative Regulation of T Cell Receptor – Lipid Raft Interaction by Cytotoxic T Lymphocyte – associated Antigen 4 The Journal of Experimental Medicine. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20021646>
- Chuang, E., Fisher, T. S., Morgan, R. W., Robbins, M. D., Duerr, J. M., Heiden, M. G. Vander, ... Knapp, G. (2000). The CD28 and CTLA-4 Receptors Associate with the Serine / Threonine Phosphatase PP2A. *Immunity*, 13, 313–322.
- Chuang, E., Lee, K., Robbins, M. D., Duerr, M., Alegre, M., Hambor, J. E., ... Thompson, C. B. (1999). Regulation of Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Molecule-4 by Src Kinases. *The Journal of Immunology*.
- Cohen, A. D., Schaer, D. A., Liu, C., Li, Y., Hirschhorn-Cymerman, D., Kim, S. C., ... Wolchok, J. D. (2010). Agonist Anti-GITR Monoclonal Antibody Induces Melanoma Tumor Immunity in Mice by Altering Regulatory T Cell Stability and Intra-Tumor Accumulation. *PLOS ONE*, 5(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010436>
- Collette, Y., Razanajaona, D., Ghiotto, M., & Olive, D. (1997). CD28 can promote T cell survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism. *European Journal of Immunology*, 27(12), 3283–3289. <https://doi.org/10.1002/eji.1830271227>



- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22(11), 633–640. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9)
- Coulie, P. G., Karanikas, V., Dorval, T., Boon, T., Lurquin, C., Landry, C., ... Marchand, M. (2001). A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10290–10295. <https://doi.org/10.1073/pnas.161260098>
- Coulie, P. G., Van Den Eynde, B. J., Van Der Bruggen, P., & Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/nrc3670>
- Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: Keys to effective T-cell immunity? *Nature Reviews Immunology*, 3(8), 609–620. <https://doi.org/10.1038/nri1148>
- Curiel, T. J., Wei, S., Dong, H., Chen, L., & Zou, W. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell – mediated antitumor immunity. *Nature Medicine*, 9(5), 5–10. <https://doi.org/10.1038/nm>
- Curran, M. A., & Allison, J. P. (2009). Tumor Vaccines Expressing Flt3 Ligand Synergize with CTLA-4 Blockade to Reject Preimplanted Tumors. *Immunology*, (19), 7747–7756. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3289>
- Curran, M. A., Geiger, T. L., Montalvo, W., Kim, M., Reiner, S. L., Al-shamkhani, A., ... Allison, J. P. (2013). Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(4), 743–755. <https://doi.org/10.1084/jem.20121190>
- Curran, M. A., Kim, M., Montalvo, W., Al-shamkhani, A., & Allison, J. P. (2011). Combination CTLA-4 Blockade and 4-1BB Activation Enhances Tumor Rejection by Increasing T-Cell Infiltration , Proliferation , and Cytokine Production. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019499>
- Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H., & Allison, J. P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 8–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915174107>
- Curtsinger, J. M., Agarwal, P., Lins, D. C., & Mescher, M. F. (2012). Autocrine IFN-  $\gamma$  Promotes Naive CD8 T Cell Differentiation and Synergizes with IFN-  $\alpha$  To Stimulate Strong Function. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102727>
- Curtsinger, J. M., Lins, D. C., & Mescher, M. F. (2003). Signal 3 Determines Tolerance versus Full Activation of Naive CD8 T Cells : Dissociating Proliferation and Development of Effector Function. *Journal of Experimental Medicine*, 197(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20021910>
- Curtsinger, J. M., Schmidt, C. S., Mondino, A., Lins, C., Kedl, R. M., Jenkins, M. K., ... Mescher, M. F. (1999). Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4 + and CD8 + T Cells. *The Journal of Immunology*.
- Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D., & Mescher, M. F. (2005). Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8. *The Journal of Immunology*, 8–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4465>

- Dardalhon, V., Schubart, A. S., Reddy, J., Meyers, J. H., Monney, L., Sabatos, C. A., ... Kuchroo, V. K. (2005). CD226 Is Specifically Expressed on the Surface of Th1 Cells and Regulates Their Expansion and Effector Functions. *The Journal of Immunology*, *175*(3), 1558–1565. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1558>
- Das, R., Verma, R., Sznol, M., Boddupalli, S., Gettinger, S. N., Kluger, H., ... Dhodapkar, K. M. (2015). Combination Therapy with Anti – CTLA-4 and Anti – PD-1 Leads to Distinct Immunologic Changes In Vivo. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401686>
- Delgoffe, G. M., Yano, H., Normolle, D. P., Vignali, D. A. A., Ferris, R. L., Sander, C., ... Bruno, T. C. (2017). Interferon- $\gamma$  Drives T reg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell*, *169*(6), 1130–1141.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.005>
- Dennehy, K. M., Elias, F., Luhder, F., Hunig, T., Na, S.-Y., & Fischer, K.-D. (2007). Mitogenic CD28 Signals Require the Exchange Factor Vav1 to Enhance TCR Signaling at the SLP-76-Vav-Itk Signalosome. *The Journal of Immunology*, *178*(3), 1363–1371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1363>
- Denton, A. E., Roberts, E. W., Linterman, M. A., & Fearon, D. T. (2014). Fibroblastic reticular cells of the lymph node are required for retention of resting but not activated CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(33), 12139–12144. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412910111>
- Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M., & Raulet, D. H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*, *413*(6852), 165–171. <https://doi.org/10.1038/35093109>
- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN $\gamma$  receptors. *Immunity*, *1*(6), 447–456. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90087-6)
- Dinkel, B. A., Kremer, K. N., Rollins, M. R., Medlyn, M. J., & Hedin, K. E. (2018). GRK2 mediates TCR-induced transactivation of CXCR4 and TCR – CXCR4 complex formation that drives PI3K/ PREX1 signaling and T cell cytokine secretion. *Journal of Biological Chemistry*, *293*, 14022–14039. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003097>
- Djenidi, F., Adam, J., Goubar, A., Durgeau, A., Meurice, G., de Montpréville, V., ... Mami-Chouaib, F. (2015). CD8+CD103+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Tumor-Specific Tissue-Resident Memory T Cells and a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer Patients. *The Journal of Immunology*, *140*2711. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402711>
- Dobrzanski, M. J. (2013). Expanding roles for CD4T cells and their subpopulations in tumor immunity and therapy. *Frontiers in Immunology*, *3*(March), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00063>
- Dong, H., Tamada, K., Zhu, G., Feng, Roche, P. C., Tamura, H., ... Hirano, F. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, *8*(8), 793–800. <https://doi.org/10.1038/nm730>
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Flies, D. B., Deursen, J. M. A. Van, & Chen, L. (2004). B7-H1 Determines Accumulation and Deletion of Intrahepatic CD8  $\gamma$  T Lymphocytes. *Immunity*, *20*, 327–336.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immuno- surveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, *3*(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Duraiswamy, J., Kaluza, K. M., Freeman, G. J., & Coukos, G. (2013). Dual Blockade of PD-1 and CTLA-4 Combined with Tumor Vaccine Effectively Restores T-Cell Rejection Function in Tumors. *Cancer Research*, *4*–15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4100>

- Dustin, M. L., & Cooper, J. A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature Immunology*, *1*(1), 23–29. <https://doi.org/10.1038/76877>
- Egen, J. G., & Allison, J. P. (2002). Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 Accumulation in the Immunological Synapse Is Regulated by TCR Signal Strength University of California at Berkeley. *Immunity*, *16*, 23–35.
- El-Sherbiny, Y. M., Meade, J. L., Holmes, T. D., McGonagle, D., Mackie, S. L., Morgan, A. W., ... Cook, G. P. (2007). The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Research*, *67*(18), 8444–8449. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4230>
- Enqvist, M., Ask, E. H., Forslund, E., Carlsten, M., Abrahamsen, G., Béziat, V., ... Malmberg, K.-J. (2015). Coordinated Expression of DNAM-1 and LFA-1 in Educated NK Cells. *The Journal of Immunology*, *194*(9), 4518–4527. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401972>
- Eriksson, E. M., Keh, C. E., Deeks, S. G., Martin, J. N., Hecht, F. M., & Nixon, D. F. (2012). Differential Expression of CD96 Surface Molecule Represents CD8 + T Cells with Dissimilar Effector Function during HIV-1 Infection. *PLoS ONE*, *7*(12), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051696>
- Eyles, J., Puaux, A. L., Wang, X., Toh, B., Prakash, C., Hong, M., ... Abastado, J. P. (2010). Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(6), 2030–2039. <https://doi.org/10.1172/JCI42002>
- Faure, F., Carcelain, G., Triebel, F., Viel, S., Hercend, T., Ferradini, L., & Mackensen, A. (1993). Evidence for in situ amplification of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in a human regressive melanoma. *Cancer Research*, *3*, 29. <https://doi.org/10.1097/00008390-199309002-00106>
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., & Münz, C. (2002). Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells. *Journal of Experimental Medicine*, *195*(3), 343–351. <https://doi.org/10.1084/jem.20011149>
- Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., ... Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature Medicine*, *5*(4), 405–411. <https://doi.org/10.1038/7403>
- Ferradini, L., Mackensen, A., Genevée, C., Bosq, J., Duvillard, P., Avril, M. F., & Hercend, T. (1993). Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma: Evidence for in situ T cell clonal expansion. *Journal of Clinical Investigation*, *91*(3), 1183–1190. <https://doi.org/10.1172/JCI116278>
- Fife, B. T., Pauken, K. E., Eagar, T. N., Obu, T., Wu, J., Azuma, M., ... Bluestone, J. A. (2009). Interactions between programmed death-1 and programmed death ligand-1 promote tolerance by blocking the T cell receptor- induced stop signal. *Nature Immunology*, *10*(11), 1185–1192. <https://doi.org/10.1038/ni.1790>. Interactions
- Fischer, K., Kong, Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengère, L. E. M., Kozieradzki, I., ... Penninger, J. M. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Current Biology*.
- Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I. F., Sander, C., ... Zarour, H. M. (2012). CD8 + T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Research*, *72*(4), 887–896. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2637>

- Franciszekiewicz, K., Le Floch, A., Boutet, M., Vergnon, I., Schmitt, A., & Mami-Chouaib, F. (2013). CD103 or LFA-1 Engagement at the Immune Synapse between Cytotoxic T Cells and Tumor Cells Promotes Maturation and Regulates T-cell Effector Functions. *Cancer Research*, *73*(2), 617 LP-628. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2569>
- Fraser, J. H., Rinc, M., Mccoy, K. D., & Gros, G. Le. (1999). CTLA4 ligation attenuates AP-1 , NFAT and NF- B B activity in activated T cells. *European Journal of Immunology*, 838–844.
- Freeman, Gordon J.Collins, M., Byrne, M. C., Bowman, M. R., Fitz, L. J., Nishimura, H., Freeman, G. J., ... Iwai, Y. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(7), 1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
- Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, *12*, 298. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrc3245>
- Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Andrey, S., & Colonna, M. (2004). Cutting Edge: CD96 (Tactile) Promotes NK Cell-Target Cell Adhesion by Interacting with the Poliovirus Receptor (CD155). *The Journal of Immunology*, *96*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.3994>
- Fuhrman, C. A., Yeh, W.-I., Seay, H. R., Saikumar Lakshmi, P., Chopra, G., Zhang, L., ... Brusko, T. M. (2015). Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226. *The Journal of Immunology*, *195*(1), 145–155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402381>
- Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Steinman, R. M., & Bonito, A. J. (2004). The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells In Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and CD80/86 Costimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, *199*(12), 1607–1618. <https://doi.org/10.1084/jem.20040317>
- Gaffen, S. L. (2001). Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*, *14*(2), 63–77. <https://doi.org/10.1006/cyto.2001.0862>
- Gajewski, T. F., Fallarino, F., & Fields, P. E. (2001). Threshold of Primed CD8 + TCR-Transgenic Absence of CTLA-4 Lowers the Activation T Cells: Lack of Correlation with Src Homology Domain 2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.3900>
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., ... Pagès, F. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science*, *313*(5795), 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
- Gao, J., Zheng, Q., Xin, N., Wang, W., & Zhao, C. (2017). CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/cas.13324>
- Gattinoni, L., Klebanoff, C. A., Palmer, D. C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., ... Restifo, N. P. (2005). Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(6), 1616–1626. <https://doi.org/10.1172/JCI24480>
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., ... Restifo, N. P. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*, *17*, 1290. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nm.2446>

- Gattinoni, L., Powell, D. J., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nature Reviews Immunology*, *6*(5), 383–393. <https://doi.org/10.1038/nri1842>
- Gattinoni, L., Zhong, X.-S., Palmer, D. C., Ji, Y., Hinrichs, C. S., Yu, Z., ... Restifo, N. P. (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8<sup>+</sup> memory stem cells. *Nature Medicine*, *15*, 808. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nm.1982>
- Gaud, G., Roncagalli, R., Chaoui, K., Bernard, I., Familiades, J., Colacios, C., ... Saoudi, A. (2018). The CD226 costimulatory molecule uses VAV1 to amplify TCR signals and to promote IL-17 production by CD4 T cells Guillaume. *Science Signaling*, *3083*.
- Geginat, J., Geginat, J., Lanzavecchia, A., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., & Sallusto, F. (2003). Proliferation and differentiation potential of human CD8. *Blood*, *101*(June), 4260–4266. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3577>.Supported
- Gentzler, R., Rahma, O. E., Dillon, P., Kunk, P. R., Hall, R., Gaughan, E., & Slingluff, C. L. (2016). Beyond melanoma: inhibiting the PD-1/PD-L1 pathway in solid tumors. *Immunotherapy*, *8*(5), 583–600. <https://doi.org/10.2217/imt-2015-0029>
- Gevensleben, H., Jung, K., Brossart, P., Majores, M., Müller, S., Golletz, C., ... Thiesler, T. (2015). The Immune Checkpoint Regulator PD-L1 Is Highly Expressed in Aggressive Primary Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, *22*(8), 1969–1977. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-2042>
- Gilfillan, S., Chan, C. J., Cella, M., Haynes, N. M., Rapaport, A. S., Boles, K. S., ... Colonna, M. (2008). DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(13), 2965–2973. <https://doi.org/10.1084/jem.20081752>
- Giovanna, M., Lutsiak, M. E. C., Takai, S., Mostböck, S., Farsaci, B., Semnani, R. T., ... Schlom, J. (2009). TGF- $\beta$  modulates the functionality of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells through effects on TCR signaling and Spred1 expression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *58*(11), 1809–1818. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0692-9>.TGF-
- Goldberg, M. V., Maris, C. H., Hipkiss, E. L., Flies, A. S., Zhen, L., Tuder, R. M., ... Drake, C. G. (2017). Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood*, *110*(1), 186–193. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-062422>.The
- Gong, J., Zhu, C., Zhuang, R., Song, C., Li, Q., Xu, Z., ... Jin, B. (2009). Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay system for determining soluble CD96 and its application in the measurement of sCD96 in patients with viral hepatitis B and hepatic cirrhosis. *Clinical & Experimental Immunology*, *155*(2), 207–215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03829.x>
- Gopal, A. K., Bartlett, N. L., Levy, R., Houot, R., Smith, S. D., Segal, N. H., ... Kohrt, H. E. (2015). A phase I study of PF-05082566 (anti-4-1BB) + rituximab in patients with CD20<sup>+</sup> NHL. *Journal of Clinical Oncology*, *33*(15\_suppl), 3004. [https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15\\_suppl.3004](https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.3004)
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., & Dustin, M. L. (1999). The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science*, *194*(9), 4066–4072. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/194/9/4066.short>
- Granier, C., Dariane, C., Combe, P., Verkarre, V., Urien, S., Badoual, C., ... Tartour, E. (2017). Tim-3 Expression on Tumor-Infiltrating PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Cells Correlates with Poor Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research*, *77*(5), 1075 LP-1082. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0274>

- Gubin, M. M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J. P., Noguchi, T., ... Cornelis, J. M. (2014). Checkpoint Blockade Cancer Immunotherapy Targets Tumour- Specific Mutant Antigens. *Nature*, *515*(7528), 577–581. <https://doi.org/10.1038/nature13988>. Checkpoint
- Guillerey, C., De Andrade, L. F., Vuckovic, S., Miles, K., Ngiow, S. F., Yong, M. C. R., ... Martinet, L. (2015). Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(5), 2077–2089. <https://doi.org/10.1172/JCI77181>
- Guillerey, C., Harjunpää, H., Carrié, N., Kasseem, S., Teo, T., Miles, K., ... Smyth, M. J. (2018). TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8+ T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood*, *132*(16), 1689–1694. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-825265>
- Gurney, A. L., Marsters, S. A., Huang, A., Pitti, R. M., Mark, M., Baldwin, D. T., ... Ashkenazi, A. (1999). Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Current Biology*, *9*(4), 215–218. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80093-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80093-1)
- Hafler, J. P., Maier, L. M., Cooper, J. D., Plagnol, V., Hinks, A., Simmonds, J., ... Sclerosis, M. (2009). CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes and Immunity*, *10*(1), 5–10. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.82>. CD226
- Hara, H., Wada, T., Bakal, C., Koziaradzki, I., Suzuki, S., Suzuki, N., ... Penninger, J. M. (2003). The MAGUK Family Protein CARD11 Is Essential for Lymphocyte Activation. *Immunity*, *18*(6), 763–775. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00148-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00148-1)
- Hashimoto-Tane, A., Sakuma, M., Ike, H., Yokosuka, T., Kimura, Y., Ohara, O., & Saito, T. (2016). Micro-adhesion rings surrounding TCR microclusters are essential for T cell activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *213*(8), 1609–1625. <https://doi.org/10.1084/jem.20151088>
- He, R., Hou, S., Liu, C., Zhang, A., Bai, Q., Han, M., ... Ye, L. (2016). Follicular CXCR5- expressing CD8(+) T cells curtail chronic viral infection. *Nature*, *537*(7620), 412–428. <https://doi.org/10.1038/nature19317>
- Hernandez-chacon, J. A., Li, Y., Wu, R. C., Bernatchez, C., Weber, J., Hwu, P., & Radvanyi, L. (2012). Co-stimulation through the CD137/4-1BB pathway protects human melanoma tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death and enhances anti-tumor effector function. *Journal of Immunotherapy*, *34*(3), 236–250. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318209e7ec>. Co-stimulation
- Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H., Wang, S., Ichikawa, M., ... Chen, L. (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. *Cancer Research*, *65*(3), 1089–1097.
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., Keeffe, M. O., & Keeffe, M. O. (2001). Differential Production of IL-12, IFN-  $\alpha$  , and IFN-  $\gamma$  by Mouse Dendritic Cell Subsets. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.9.5448>
- Hodi, F. S., Day, S. J. O., Mcdermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., ... Quirt, I. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*, *363*(8), 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>. Improved
- Holoch, P. A., & Griffith, T. S. (2009). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*, *625*(1–3), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.066>

- Hombrink, P., Helbig, C., Backer, R. A., Piet, B., Oja, A. E., Stark, R., ... van Lier, R. A. W. (2016). Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8+ lung-resident memory T cells. *Nature Immunology*, *17*, 1467. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ni.3589>
- Hou, S., Ge, K., Zheng, X., Wei, H., Sun, R., & Tian, Z. (2014). CD226 protein is involved in immune synapse formation and triggers natural killer (NK) cell activation via its first extracellular domain. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(10), 6969–6977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.498253>
- Houmadi, R., Guipouy, D., Rey-Barroso, J., Vasconcelos, Z., Cornet, J., Manghi, M., ... Dupré, L. (2018). The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Contributes to the Assembly of the LFA-1 Nanocluster Belt at the Lytic Synapse. *Cell Reports*, *22*(4), 979–991. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.088>
- Huang, A. C., Postow, M. A., Orlowski, R. J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S., ... Wherry, E. J. (2017). T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*, *545*, 60. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature22079>
- Huang, M. (2017). CD155 expression and its correlation with clinicopathologic characteristics , angiogenesis , and prognosis in human cholangiocarcinoma. *Oncotargets and Therapy*, 3817–3825.
- Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M. J., Heidi, A., ... Vale, D. (2018). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1– mediated inhibition. *Science*, *355*(6332), 1428–1433. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1292>
- Hurtado, J. C., Kim, Y. J., & Kwon, B. S. (1997). Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *The Journal of Immunology*, *158*(6), 2600–2609. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/158/6/2600>
- Hurtado, J., Kim, S., & Kwon, B. (1995). Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *The Journal of Immunology*.
- Hurwitz, A. A., Yu, T. F.-Y., Leach, D. R., & Allison, J. P. (1998). CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(17), 10067–10071. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10067>
- Huster, K. M., Kerksiek, K. M., Schiemann, M., Wagner, H., Linkemann, K., Busch, V., & Busch, D. H. (2004). Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(15), 5610–5615. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308054101>
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., & Kroczek, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, *100*(1981), 263–266.
- Ichii, H., Sakamoto, A., Hatano, M., Okada, S., Toyama, H., Taki, S., ... Tokuhisa, T. (2002). Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nature Immunology*, *3*, 558. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ni802>
- Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y., Tokuhisa, T., & Alerts, E. (2004). Bcl6 Acts as an Amplifier for the Generation and Proliferative Capacity of Central Memory CD8 + T Cells. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.883>
- Iguchi-Manaka, A., Kai, H., Yamashita, Y., Shibata, K., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., ... Shibuya, A. (2008). Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(13), 2959–2964. <https://doi.org/10.1084/jem.20081611>

- Ikedo, W., Kakunaga, S., Takekuni, K., Shingai, T., Satoh, K., Morimoto, K., ... Takai, Y. (2004). Nectin-like Molecule-5 / TAGE4 Enhances Cell Migration in an Integrin-dependent, Nectin-3-independent Manner \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 18015–18025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312969200>
- Im, S. J., Hashimoto, M., Gerner, M. Y., Lee, J., Kissick, H. T., Burger, M. C., ... Ahmed, R. (2016). Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature*, 537(7620), 417–421. <https://doi.org/10.1038/nature19330>
- Intlekofer, A. M., Takemoto, N., Wherry, E. J., Longworth, S. A., Northrup, J. T., Palanivel, V. R., ... Reiner, S. L. (2005). Effector and memory CD8 + T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature Immunology*, 6(12). <https://doi.org/10.1038/ni1268>
- Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., & Honjo, T. (2003). PD-1 Inhibits Antiviral Immunity at the Effector Phase in the Liver. *The Journal of Experimental Medicine*. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20022235>
- Janssen, E. M., Droin, N. M., Lemmens, E. E., Pinkoski, M. J., Bensinger, S. J., Ehst, B. D., ... Schoenberger, S. P. (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*, 434(7029), 88–93. <https://doi.org/10.1038/nature03337>
- Jin, B., Scott, J. L., Vadas, M. A., & Burns, G. F. (1989). TGF beta down-regulates TLISA1 expression and inhibits the differentiation of precursor lymphocytes into CTL and LAK cells. *Immunology*, 66(4), 570–576.
- Jin, H.-T., Anderson, A. C., Tan, W. G., West, E. E., Ha, S.-J., Araki, K., ... Ahmed, R. (2010). Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14733–14738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009731107>
- Johnston, R. J., Combs-agrar, L., Hackney, J., Yu, X., Huseni, M., Yang, Y., ... Grogan, J. L. (2014). The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8 + T Cell Effector Function. *Cancer Cell*, 923–937. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.10.018>
- Joller, N., Hafler, J. P., Brynedal, B., Kassam, N., Spoerl, S., Levin, S. D., ... Kuchroo, V. K. (2011). Cutting Edge: TIGIT Has T Cell-Intrinsic Inhibitory Functions. *The Journal of Immunology*, 186(3), 1338–1342. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003081>
- Joller, N., Lozano, E., Burkett, P. R., Patel, B., Xiao, S., Zhu, C., ... Kuchroo, V. K. (2014). Treg Cells Expressing the Coinhibitory Molecule TIGIT Selectively Inhibit Proinflammatory Th1 and Th17 Cell Responses. *Immunity*, 40(4), 569–581. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.012>
- Joshi, N. S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H. K., Urso, D. R., Gapin, L., ... Chi, H. (2007). Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8(+) T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity*, 12(2), 281–295. <https://doi.org/10.1038/nri3198>
- Ju, S.-A., Cheon, S.-H., Park, S.-M., Tam, N. Q., Kim, Y. M., An, W. G., & Kim, B.-S. (2008). Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice. *International Journal of Cancer*, 122(12), 2784–2790. <https://doi.org/10.1002/ijc.23457>
- Ju, S.-A., Lee, S.-C., Kwon, T.-H., Heo, S.-K., Park, S.-M., Paek, H.-N., ... Kim, B.-S. (2005). Immunity to melanoma mediated by 4-1BB is associated with enhanced activity of tumour-infiltrating lymphocytes. *Immunology & Cell Biology*, 83(4), 344–351. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01330.x>



- Juneja, V. R., Mcguire, K. A., Manguso, R. T., Lafleur, M. W., Collins, N., Haining, W. N., ... Sharpe, A. H. (2017). PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *The Journal of Experimental Medicine*, 895–904.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., ... Lang, R. A. (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*, 17(2), 211–220. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196292>
- Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D., & Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature Immunology*, 4(12), 1191–1198. <https://doi.org/10.1038/ni1009>
- Kafrouni, M. I., Brown, G. R., & Thiele, D. L. (2003). The role of TNF – TNFR2 interactions in generation of CTL responses and clearance of hepatic adenovirus infection Abstract : Deficiency or inhibition of tumor ne- crosis factor ( TNF ) significantly prolongs hepatic. *Journal of Leurcoyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.0103035>
- Kakunaga, S., Ikeda, W., Shingai, T., Fujito, T., Yamada, A., Minami, Y., ... Takai, Y. (2004). Enhancement of Serum- and Platelet-derived Growth Factor-induced Cell Proliferation by Necl-5 / TAGE4 / Poliovirus Receptor / CD155 through the Ras-Raf-MEK-ERK Signaling \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36419–36425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406340200>
- Kallies, A., Hawkins, E. D., Belz, G. T., Metcalf, D., Hommel, M., Corcoran, L. M., ... Nutt, S. L. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nature Immunology*, 7, 466. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ni1321>
- Kallies, A., Xin, A., Belz, G. T., & Nutt, S. L. (2009). Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8 + T Cells and Memory Responses. *Immunity*, 31(2), 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.021>
- Kammertoens, T., Jagsi, R., Jiang, J., Momoh, A. O., Alderman, A., Giordano, S. H., ... Smith, B. D. (2017). Tumour ischaemia by interferon- $\gamma$  resembles physiological blood vessel regression. *Nature*, 263(2), 219–227. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001177.Complications>
- Kamphorst, A. O., Pillai, R. N., Yang, S., Nasti, T. H., Akondy, R. S., & Wieland, A. (2017). Proliferation of PD-1 + CD8 T cells in peripheral blood after PD-1 – targeted therapy in lung cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(19), 4993–4998. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705327114>
- Kamran, N., Takai, Y., Miyoshi, J., Biswas, S. K., Wong, J. S. B., & Gasser, S. (2013). Toll-Like Receptor Ligands Induce Expression of the Costimulatory Molecule CD155 on Antigen-Presenting Cells. *PLOS ONE*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054406>
- Kansy, B. A., Concha-benavente, F., Srivastava, R. M., Jie, H., Shayan, G., Lei, Y., ... Ferris, R. L. (2017). PD-1 Status in CD8+ T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer. *Cancer Research*, (8), 6353–6365. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3167>
- Kaplan, D. H., Stockert, E., Schreiber, R. D., Dighe, A. S., Old, L. J., Shankaran, V., & Aguet, M. (1998). Demonstration of an interferon -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7556–7561. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7556>

- Karandikar, N. J. (1996). CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2), 783–788. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.783>
- Kearney, C. J., Ramsbottom, K. M., Voskoboinik, I., Darcy, P. K., & Oliaro, J. (2016). Loss of DNAM-1 ligand expression by acute myeloid leukemia cells renders them resistant to NK cell killing. *Onc Immunology*, 5(8), 1–12. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1196308>
- Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., ... Sharpe, A. H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 883–895. <https://doi.org/10.1084/jem.20051776>
- Kelly, E., Won, A., Refaeli, Y., & Van Parijs, L. (2002). IL-2 and Related Cytokines Can Promote T Cell Survival by Activating AKT. *The Journal of Immunology*, 168(2), 597–603. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.597>
- Kelly, J. M., Darcy, P. K., Godfrey, D. I., Takeda, K., Yagita, H., Smyth, M. J., & Markby, J. L. (2001). Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nature Immunology*, 3(1), 83–90. <https://doi.org/10.1038/ni746>
- Khong, H. T., Wang, Q. J., & Rosenberg, S. A. (2004). Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: Tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *Journal of Immunotherapy*, 27(3), 184–190. <https://doi.org/10.1097/00002371-200405000-00002>
- Kim, E. Y., & Teh, H. (2001). TNF Type 2 Receptor (p75) Lowers the Threshold of T Cell Activation. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.6812>
- Kim, E. Y., & Teh, H. (2004). Critical Role of TNF Receptor Type-2 (p75) as a Costimulator for IL-2 Induction and T Cell Survival: A Functional Link to CD28. *The Journal of Immunology*, 2. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4500>
- Kim, H. S., & Long, E. O. (2010). Synergistic Signals for Natural Cytotoxicity Are Required to Overcome Inhibition by c-Cbl. *Immunity*, 32(2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.02.004.Synergistic>
- Kim, H. S., & Long, E. O. (2013). Complementary Phosphorylation Sites in the Adaptor Protein SLP-76 Promote Synergistic Activation of Natural Killer Cells. *Science Signaling*, 5(232). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002754.Complementary>
- Kim, H., Tharayil, M., & Rudd, C. E. (1998). Growth Factor Receptor-bound Protein 2 SH2 / SH3 Domain Binding to CD28 and Its Role in Co-signaling \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(1), 296–301.
- Kim, J. A., Averbook, B. J., Chambers, K., Rothchild, K., Kjaergaard, J., Papay, R., & Shu, S. (2001). Divergent Effects of 4-1BB Antibodies on Antitumor Immunity and on Tumor-reactive T-Cell Generation. *Cancer Research*, 61(5), 2031–2037. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/5/2031>
- Kim, J. S., Shin, B. R., Lee, H. K., Lee, J. H., Kim, K. H., Choi, J. E., ... Han, S.-B. (2017). Cd226<sup>-/-</sup> natural killer cells fail to establish stable contacts with cancer cells and show impaired control of tumor metastasis in vivo. *Onc Immunology*, 6(8), e1338994. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1338994>
- Kjærgaard, J., Tanaka, J., Kim, J. A., Rothchild, K., Weinberg, A., & Shu, S. (2000). Therapeutic Efficacy of OX-40 Receptor Antibody Depends on Tumor Immunogenicity and Anatomic Site of Tumor Growth 1. *Cancer Research*, 5514–5521.

- Klebanoff, C. A., Gattinoni, L., Torabi-Parizi, P., Kerstann, K., Cardones, A. R., Finkelstein, S. E., ... Restifo, N. P. (2005). Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(27), 9571–9576. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503726102>
- Knudson, K. M., Goplen, N. P., Cunningham, C. A., Daniels, M. A., & Teixeira, E. (2013). Low-Affinity T Cells Are Programmed to Maintain Normal Primary Responses but Are Impaired in Their Recall to Low-Affinity Ligands. *Cell Reports*, *4*(3), 554–565. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.008>
- Knudson, K. M., Hamilton, S. E., Daniels, M. A., Jameson, S. C., Teixeira, E., & Teixeira, E. (2013). Cutting Edge: The Signals for the Generation of T Cell Memory Are Qualitatively Different Depending on TCR Ligand Strength. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300905>
- Ko, K., Yamazaki, S., Nakamura, K., Nishioka, T., Hirota, K., Yamaguchi, T., ... Sakaguchi, S. (2005). Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(7), 885–891. <https://doi.org/10.1084/jem.20050940>
- Kocak, E., Lute, K., Chang, X., May, K. F., Exten, K. R., Zhang, H., ... Liu, Y. (2006). Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. *Cancer Research*, *66*(14), 7276–7284. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2128>
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., ... Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, *450*(7171), 903–907. <https://doi.org/10.1038/nature06309>
- Kong, Y., Zhu, L., Schell, T. D., Zhang, J., Claxton, D. F., Ehmann, W. C., ... Zheng, H. (2016). T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8 $\beta$  T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2626>
- Konishi, J., Yamazaki, K., Azuma, M., Kinoshita, I., & Dosaka-akita, H. (2004). B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression. *Clinical Cancer Research*, *10*, 5094–5100.
- Kourepini, E., Paschalidis, N., Simoes, D. C. M., Aggelakopoulou, M., Grogan, J. L., & Panoutsakopoulou, V. (2016). TIGIT Enhances Antigen-Specific Th2 Recall Responses and Allergic Disease. *The Journal of Immunology*, *196*(9), 3570–3580. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501591>
- Krawczyk, C., Oliveira-dos-santos, A., Sasaki, T., Griffiths, E., Ohashi, P. S., Snapper, S., ... Penninger, J. M. (2002). Vav1 Controls Integrin Clustering and MHC / Peptide-Specific Cell Adhesion to Antigen-Presenting Cells. *Immunity*, *16*, 331–343.
- Krummel, B. M. E., & Allison, J. P. (1996). CTLA-4 Engagement Inhibits IL-2 Accumulation and Cell Cycle Progression upon Activation of Resting T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(June), 0–7.
- Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T cells to Stimulation. *Journal of Experimental Medicine*, *37*(11), 2137–2141. Retrieved from <http://www3.ocn.ne.jp/~ccp/%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=2011432966%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med5&NEWS=N&AN=21084813>

- Kundig, T. M., Shahinian, A., Kawai, K., Mittru, H., Sebzda, E., Bachmann, M. F., ... Ohashi, P. S. (1996). Duration of TCR Stimulation Determines Costimulatory Requirement of T Cells. *Immunity*, *5*, 41–52.
- Kurtulus, S., Madi, A., Kuchroo, V. K., Regev, A., & Correspondence, A. C. A. (2018). Checkpoint Blockade Immunotherapy Induces Dynamic Changes in PD-1-CD8 + Tumor-Infiltrating T Cells. *Immunity*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.014>
- Kurtulus, S., Sakuishi, K., Ngiow, S. F., Joller, N., Tan, D. J., Teng, M. W. L., ... Anderson, A. C. (2015). TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(11), 4053–4062. <https://doi.org/10.1172/JCI81187>
- Kurz, E. U., & Lees-Miller, S. P. (2004). DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair*, *3*(8–9), 889–900. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.029>
- Laderach, D., Movassagh, M., Johnson, A., Mittler, R. S., & Galy, A. (2002). 4-1BB co-stimulation enhances human CD8+ T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8+ T cells Diego. *Journal of Immunology*, *14*(10), 1155–1167.
- Lagrue, K., Kennedy, P. R., Williamson, D. J., & Davis, D. M. (2013). The central role of the cytoskeleton in mechanisms and functions of the NK cell immune synapse, 203–221.
- Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T. H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., ... Colucci, F. (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(5), 1251–1263. <https://doi.org/10.1172/JCI36022DS1>
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science*, *271*(March), 1–4.
- Lee, H., Park, S., Choi, B. K., Hwa, H., Nam, K., & Kwon, B. S. (2002). 4-1BB Promotes the Survival of CD8 + T Lymphocytes by Increasing Expression of Bcl-x L and Bfl-1. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.4882>
- Lee, J. H., Elly, C., Park, Y., & Liu, Y.-C. (2015). E3 Ubiquitin Ligase VHL Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  to Maintain Regulatory T Cell Stability and Suppressive Capacity. *Immunity*, *42*(6), 1062–1074. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.016>
- Lee, K.-H. (2002). T Cell Receptor Signaling Precedes Immunological Synapse Formation. *Science*, *295*(5559), 1539–1542. <https://doi.org/10.1126/science.1067710>
- Lee, K., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D. K., Zhang, W., ... Bluestone, J. A. (1998). Molecular Basis of T Cell Inactivation by CTLA-4. *Science*, *282*(December), 2263–2267.
- Lee, S.-J., Myers, L., Muralimohan, G., Dai, J., Qiao, Y., Li, Z., ... Vella, A. T. (2004). 4-1BB and OX40 Dual Costimulation Synergistically Stimulate Primary Specific CD8 T Cells for Robust Effector Function. *The Journal of Immunology*, *173*(5), 3002–3012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3002>
- Lengagne, R., Fiette, L., Nakashima, I., Kato, M., Rénia, L., Garcette, M., ... Briand, J.-P. (2004). Spontaneous Vitiligo in an Animal Model for Human Melanoma. *Cancer Research*, *64*(4), 1496–1501. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2828>
- Lengagne, R., Renia, L., Avril, M.-F., Kato, M., Abastado, J.-P., Garcette, M., ... Engelhard, V. H. (2008). Distinct Role for CD8 T Cells toward Cutaneous Tumors and Visceral Metastases. *The Journal of Immunology*, *180*(1), 130–137. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.130>

- Levin, S. D., Taft, D. W., Brandt, C. S., Bucher, C., Howard, E. D., Chadwick, E. M., ... Lewis, K. E. (2011). Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *European Journal of Immunology*, 41(4), 902–915. <https://doi.org/10.1002/eji.201041136>
- Li, B., Lin, J., Vanroey, M., Jure-kunkel, M., & Jooss, K. (2007). Established B16 tumors are rejected following treatment with GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapy in combination with anti-4-1BB mAb. *Clinical Immunology*, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.07.005>
- Li, D., Molldrem, J. J., & Ma, Q. (2009). LFA-1 regulates CD8+ T cell activation via T cell receptor-mediated and LFA-1-mediated Erk1/2 signal pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 21001–21010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002865>
- Li, J., He, Y., Hao, J., Ni, L., & Dong, C. (2018). High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8 + T Cells. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 2981. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02981>
- Li, J., Lee, Y., Li, Y., Mak, T. W., Ni, L., Dong, C., ... Chen, Y. (2018). Co-inhibitory Molecule B7 Superfamily Member 1 Expressed by Tumor-Infiltrating Myeloid Cells Induces Dysfunction of Anti-tumor CD8 + T Cells. *Immunity*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.018>
- Li, M., Xia, P., Du, Y., Liu, S., Huang, G., Chen, J., ... Fan, Z. (2014). T-cell Immunoglobulin and ITIM Domain ( TIGIT ) Receptor / Poliovirus Receptor ( PVR ) Ligand Engagement Suppresses Interferon- $\gamma$  Production of Natural Killer Cells via  $\beta$ -Arrestin 2-mediated Negative Signaling \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17647–17657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.572420>
- Li, X., Dougall, W. C., Smyth, M. J., Li, X., Das, I., Lepletier, A., ... Smyth, M. J. (2018). CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms Find the latest version : CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(6), 2613–2625.
- Lieberman, J. (2010). Granzyme A activates another way to die. *Immunological Reviews*, 235(1), 93–104. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00902.x>
- Lin, G. H. Y., Liu, Y., Ambagala, T., Kwon, B. S., Ohashi, P. S., & Tania, H. (2010). Evaluating the Cellular Targets of Anti-4-1BB Agonist Antibody during Immunotherapy of a Pre-Established Tumor in Mice. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011003>
- Lindsten, T., June, C. H., Ledbetter, J. A., Stella, G., & Thompson, C. B. (1989). Regulation of Lymphokine Messenger RNA Stability by a Surface-Mediated T Cell Activation Pathway. *Science*, (2).
- Linsley, P. S., & Ledbetter, J. A. (1993). The Role of the CD28 Receptor During T Cell Responses to Antigen. *Annual Review of Immunology*, 11(1), 191–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.001203>
- Lisbona, C., Alemany, S., & Art, M. F. (1997). Regulation of ERK2 Dephosphorylation in G 1 -Stimulated Rat T Lymphoblasts. *Journal of Clinical Immunology*, 17(6), 494–501.
- Liu, S., Zhang, H., Li, M., Hu, D., Li, C., Ge, B., ... Fan, Z. (2013). Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death and Differentiation*, 20(3), 456–464. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.141>
- Loeser, S., Beissert, S., Melief, C. J. M., Bijker, M. S., Penninger, J. M., Loeser, S., ... Rangachari, M. (2007). Spontaneous tumor rejection by cbl-b –deficient CD8 + T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(4), 879–891. <https://doi.org/10.1084/jem.20061699>

- Long, E. O. (2008). Negative signalling by inhibitory receptors : the NK cell paradigm. *Immunological Reviews*, (6), 70–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00660.x>. Negative
- Lopez, J. A., Susanto, O., Jenkins, M. R., Lukoyanova, N., Sutton, V. R., Law, R. H. P., ... Saibil, H. R. (2013). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, 121(14), 2659–2669. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-446146>. The
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481, 287. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature10760>
- Lozano, E., Dominguez-Villar, M., Kuchroo, V., & Hafler, D. A. (2012). The TIGIT/CD226 Axis Regulates Human T Cell Function. *The Journal of Immunology*, 188(8), 3869–3875. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103627>
- Lozano, E., Joller, N., Cao, Y., K. Kuchroo, V., & Hafler, D. A. (2013). The CD226/CD155 Interaction Regulates the Proinflammatory (Th1/Th17)/Anti-Inflammatory (Th2) Balance in Humans. *The Journal of Immunology*, 191(7), 3673–3680. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300945>
- Lu, L., Xu, X., Zhang, B., Zhang, R., Ji, H., & Wang, X. (2014). Combined PD-1 blockade and GITR triggering induce a potent antitumor immunity in murine cancer models and synergizes with chemotherapeutic drugs. *Journal of Translational Medicine*, 1–11.
- Lühder, F., Höglund, P., Allison, J. P., Benoist, C., & Mathis, D. (n.d.). Cytotoxic T Lymphocyte–associated Antigen 4 (CTLA-4) Regulates the Unfolding of Autoimmune Diabetes. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(3), 427–432. <https://doi.org/10.1084/jem.187.3.427>
- Mailliard, R. B., Son, Y.-I., Redlinger, R., Coates, P. T., Giermasz, A., Morel, P. A., ... Kalinski, P. (2003). Dendritic Cells Mediate NK Cell Help for Th1 and CTL Responses: Two-Signal Requirement for the Induction of NK Cell Helper Function. *The Journal of Immunology*, 171(5), 2366–2373. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2366>
- Mami-Chouaib, F., Blanc, C., Cognac, S., Hans, S., Malenica, I., Granier, C., ... Tartour, E. (2018). Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 6(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0399-6>
- Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M. A., Hieshima, K., ... Andrian, U. H. Von. (2001). Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 805–806. <https://doi.org/10.1172/JCI200113296>. Introduction
- Marengere, Luc E Waterhouse, P., Duncan, G. S., Mittrucker, H., Feng, G., & Mak, T. W. (1996). Regulation of T Cell Receptor Signaling by Tyrosine Phosphatase SYP Association with. *Science*, 272(May), 1170–1174.
- Mariathasan, S., Turley, S. J., Nickles, D., Castiglioni, A., Yuen, K., Wang, Y., ... Powles, T. (2018). TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*, 554, 544. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature25501>
- Martín-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-γ for TH1 priming. *Nature Immunology*, 5(12), 1260–1265. <https://doi.org/10.1038/ni1138>
- Martin, M., Schneider, H., Azouz, A., & Rudd, C. E. (2001). Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 and CD28 Modulate Cell Surface Raft Expression in Their Regulation of T Cell Function. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(11).

- Martinet, L., Ferrari De Andrade, L., Guillerey, C., Lee, J. S., Liu, J., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., ... Smyth, M. J. (2015). DNAM-1 expression marks an alternative program of NK cell maturation. *Cell Reports*, *11*(1), 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.006>
- Martins, G. A., Cimmino, L., Shapiro-Shelef, M., Szabolcs, M., Herron, A., Magnusdottir, E., & Calame, K. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nature Immunology*, *7*, 457. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ni1320>
- Marzo, A., Lake, R., Lo, D., Sherman, L., McWilliam, A., Nelson, D., ... Scott, B. (1999). Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes. *J Immunol*, *162*(10), 5838–5845. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10229818%5Chttp://www.jimmunol.org/content/162/10/5838.full.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10229818%5Chttp://www.jimmunol.org/content/162/10/5838.full.pdf)
- Masson, D., Jarry, A., Baurly, B., Blanchardie, P., Laboisse, C., Lustenberger, P., & Denis, M. G. (2001). Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut*, *49*(2), 236–240. <https://doi.org/10.1136/gut.49.2.236>
- Matsuzaki, J., Gnjatic, S., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Miller, A., Tsuji, T., ... Odunsi, K. (2010). Tumor-infiltrating NY-ESO-1–specific CD8 + T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(17), 7875–7880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003345107>
- May, K. F., Chen, L., Zheng, P., & Liu, Y. (2002). Anti-4-1BB Monoclonal Antibody Enhances Rejection of Large Tumor Burden by Promoting Survival but not Clonal Expansion of Tumor-specific CD8<sup>+</sup> T Cells 1. *Cancer Research*, 3459–3465.
- McKenzie, Mark DThomas, H. E., Mariana, L., Chong, M. M. W., Dudek, N. L., Kay, T. W. H., & Trapani, J. A. (2006). Perforin and Fas induced by IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  mediate beta cell death by OT-I CTL. *International Immunology*, *18*(6), 837–846. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl020>
- Médina-Echeverez, J., Wideman, T. H., Zautra, A. J., & Edwards, R. R. (2014). IFN- $\gamma$  regulates survival and function of tumor-induced CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> myeloid derived suppressor cells by modulating the anti-apoptotic molecule Bcl2a1. *European Journal of Immunology*, *154*(11), 2262–2265. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.005>. Re-Thinking
- Melero, I., Bach, N., Hellström, K. E., Aruffo, A., Mittler, R. S., & Chen, L. (1998). Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand : synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *European Journal of Immunology*, 1116–1121.
- Melero, I., Shuford, W. W., Newby, S. A., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Hellström, K. E., ... Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nature Medicine*, *3*(6), 682–685. <https://doi.org/10.1038/nm0697-682>
- Mempel, T. R., Henrickson, S. E., & von Andrian, U. H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, *427*(6970), 154–159. <https://doi.org/10.1038/nature02238>
- Meng, S., Li, L. I., Zhou, M., Jiang, W., Heng, N. I. U., & Yang, K. (2018). Distribution and prognostic value of tumor-infiltrating T cells in breast cancer. *Molecular Medicine Reports*, *18*(5), 4247–4258. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9460>
- Mescher, M. F., Curtsinger, J. M., Casey, K. A., & Hammerbeck, C. D. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8 + T cells. *Immunological Reviews*, *211*, 81–92.

- Metkar, S. S., Froelich, C. J., Desai, U. R., Raja, S. M., Wang, B., Spiegel, K., ... Dantuluri, M. (2002). Cytotoxic Cell Granule-mediated Apoptosis. *Immunity*, 277(51), 49523–49530. <https://doi.org/10.1074/jbc.m209607200>
- Michel, F., Mangino, G., Tuosto, L., Alcover, A., Olive, D., & Acuto, O. (2000). CD28 Utilizes Vav-1 to Enhance TCR-Proximal Signaling and NF-AT Activation. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3820>
- Miller, R. E., Jones, J., Le, T., Whitmore, J., Boiani, N., Gliniak, B., ... Lynch, D. H. (2002). 4-1BB-Specific Monoclonal Antibody Promotes the Generation of Tumor-Specific Immune Responses by Direct Activation of CD8 T Cells in a CD40-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.4.1792>
- Milner, J. J., Toma, C., Yu, B., Zhang, K., Omilusik, K., Phan, A. T., ... Goldrath, A. W. (2017). Runx3 programs CD8+ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature*, 552, 253. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature24993>
- Miyasaka, M., & Tanaka, T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature Reviews Immunology*, 4(5), 360–370. <https://doi.org/10.1038/nri1354>
- Monks, C. R. F., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., & Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 395(6697), 82–86. <https://doi.org/10.1038/25764>
- Motzer, R. J., Tannir, N. M., McDermott, D. F., Arén Frontera, O., Melichar, B., Choueiri, T. K., ... Escudier, B. (2018). Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 378(14), 1277–1290. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1712126>
- Muenst, S., Soysal, S. D., Gao, F., Obermann, E. C., Oertli, D., & Gillanders, W. E. (2013). The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(3), 667–676. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2581-3>
- Mumprecht, S., Schu, C., Schwaller, J., Solenthaler, M., Ochsenbein, A. F., & Pd-I, P. (2009). Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia – specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood*, 114(8), 1528–1537. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-179697.An>
- Murillo, O., Dubrot, J., Palazón, A., Arina, A., Azpilikueta, A., Alfaro, C., ... Melero, I. (2009). In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. *European Journal of Immunology*, 39(9), 2424–2436. <https://doi.org/10.1002/eji.200838958>
- Muris, J. J. F., Meijer, C. J. L. M., Cillessen, S. A. G. M., Vos, W., Kummer, J. A., Bladergroen, B. A., ... Oudejans, J. J. (2004). Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*, 18(3), 589–596. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403240>
- Muscolini, M., Camperio, C., Capuano, C., Caristi, S., Piccolella, E., Galandrini, R., & Tuosto, L. (2013). Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase  $\alpha$  Activation Critically Contributes to CD28-Dependent Signaling Responses. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203157>
- Myers, L., Croft, M., Kwon, B. S., Robert, S., Vella, A. T., Myers, L., ... Vella, A. T. (2005). Peptide-Specific CD8 T Regulatory Cells Use IFN-  $\gamma$  to Elaborate TGF-  $\beta$  -Based Suppression. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.7625>



- Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., & Ohtani, H. (1998). CD8+T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Research*, *58*(16), 3491–3494. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199707\)182:3<318::AID-PATH862>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199707)182:3<318::AID-PATH862>3.0.CO;2-6)
- Nakamoto, N., & Chang, K. (2008). Functional restoration of HCV-specific CD8 T-cells by PD1 blockade is defined by PD1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology*, *6*(11), 1249–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.07.016>. Cytokeratin
- Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., ... Ohtani, H. (2001). Proliferative Activity of Intratumoral CD8+T-Lymphocytes As a Prognostic Factor in Human Renal Cell Carcinoma : Clinicopathologic Demonstration of. *Cancer Research*, *61*, 5132–5136.
- Ni, H.-T., Deeths, M. J., & Mescher, M. F. (2001). LFA-1-Mediated Costimulation of CD8+ T Cell Proliferation Requires Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity. *The Journal of Immunology*, *166*(11), 6523–6529. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.11.6523>
- Ni, L., & Lu, J. (2018). Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Medicine*, *7*(9), 4509–4516. <https://doi.org/10.1002/cam4.1700>
- Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., ... Acuto, O. (2010). Constitutively active Ick kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity*, *32*(6), 766–777. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.011>
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., & Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, *11*(2), 141–151. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80089-8)
- Nishimura, H., Okazaki, T., & Tanaka, Y. (2001). Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor – Deficient Mice. *Science*, *291*(January), 319–323.
- Nishiwada, S., Sho, M., Yasuda, S., Shimada, K., Yamato, I., Akahori, T., ... Nakajima, Y. (2015). Clinical Significance of CD155 Expression in Human Pancreatic Cancer. *Anticancer Research*, *2298*, 2287–2297.
- Niu, L., Strahotin, S., Hewes, B., Zhang, B., Zhang, Y., Archer, D., ... Mittler, R. S. (2007). Cytokine-Mediated Disruption of Lymphocyte Trafficking, Hemopoiesis, and Induction of Lymphopenia, Anemia, and Thrombocytopenia in Anti-CD137-Treated Mice. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4194>
- Nizard, M., Roussel, H., Diniz, M. O., Karaki, S., Tran, T., Voron, T., ... Tartour, E. (2017). Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nature Communications*, *8*, 15221. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ncomms15221>
- Nocentini, G., Riccardi, C., Bartoli, A., Krausz, L. T., Moraca, R., Giunchi, L., ... Ronchetti, S. (1997). A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(12), 6216–6221. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6216>
- Orange, J. S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*, *8*(9), 713–725. <https://doi.org/10.1038/nri2381>

- Palazon, A., Teijeira, A., Peñuelas, I., Dubrot, J., Morales-kastresana, A., Luis, P., ... Melero, I. (2011). Agonist Anti-CD137 mAb Act on Tumor Endothelial Cells to Enhance Recruitment of Activated T Lymphocytes. *Cancer Research*, 801–812. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1733>
- Paley, M. A., Kroy, D. C., Odorizzi, P. M., Johnnidis, J. B., Dolfi, V., Barnett, B. E., ... Wherry, E. J. (2012). Progenitor and Terminal Subsets of CD8+ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science*, 338(6111), 1220–1225. <https://doi.org/10.1126/science.1229620>. Progenitor
- Parry, R. V, Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V, ... Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms †. *Molecular Biology of the Cell*, 25(21), 9543–9553. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9543>
- Parry, R. V, Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., & Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 1(4), 45–48. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9543>
- Pasche, B. (2001). Role of transforming growth factor beta in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 186(2), 153–168. [https://doi.org/10.1002/1097-4652\(200002\)186:2<153::AID-JCP1016>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-4652(200002)186:2<153::AID-JCP1016>3.0.CO;2-J)
- Peach, B. R. J., Bajorath, J., Brady, W., Leytze, G., Greene, J., Naemura, J., & Linsley, P. S. (1994). Complementarity Determining Region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous Regions in CTLA-4 and CD28 Determine the Binding to B7-1. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(December).
- Pearce, E. L., Mullen, A. C., Martins, A., Krawczyk, C. M., Hutchins, A. S., Zediak, V. P., ... Reiner, S. L. (2004). Control of Effector CD8+ T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. *Science*, 302(January).
- Pedros, C., Zhang, Y., Hu, J. K., Choi, Y. S., Canonigo-, A. J., Altman, A., ... Jolla, L. (2016). A TRAF-like motif of ICOS controls development of germinal center T follicular helper cells via TBK1. *Nature Immunology*, 17(7), 825–833. <https://doi.org/10.1038/ni.3463>. A
- Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J., & Allison, J. P. (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti – CTLA-4 antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(8), 1717–1725. <https://doi.org/10.1084/jem.20082492>
- Pende, D., Bottino, C., Castriconi, R., Cantoni, C., Marcenaro, S., Rivera, P., ... Moretta, A. (2005). PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: Involvement in tumor cell lysis. *Molecular Immunology*, 42(4 SPEC. ISS.), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.028>
- Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Dondero, A., ... Bottino, C. (2006). Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood*, 107(5), 2030–2036. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2696>
- Peng, Y., Xi, C., Zhu, Y., Yin, L., & Wei, J. (2016). Altered expression of CD226 and CD96 on natural killer cells in patients with pancreatic cancer. *Oncotarget*, 7(41).
- Pentcheva-Hoang, T., Egen, J. G., Wojnoonski, K., & Allison, J. P. (2004). B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*, 21(3), 401–413. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.017>
- Perez-Ruiz, E., Minute, L., Otano, I., Alvarez, M., Ochoa, M. C., Belsue, V., ... Melero, I. (2019). Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. *Nature*, 569(7756), 428–432. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1162-y>

- Perez, O. D., Mitchell, D., Jager, G. C., South, S., Murriel, C., McBride, J., ... Nolan, G. P. (2003). Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nature Immunology*, *4*(11), 1083–1092. <https://doi.org/10.1038/ni984>
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., & Valiante, N. M. (2002). Contact-dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells. *Journal of Experimental Medicine*, *195*(3), 335–341. <https://doi.org/10.1084/jem.20010934>
- Piédavent-Salomon, M., Willing, A., Engler, J. B., Steinbach, K., Bauer, S., Eggert, B., ... Friese, M. A. (2015). Multiple sclerosis associated genetic variants of CD226 impair regulatory T cell function. *Brain*, *138*(11), 3263–3274. <https://doi.org/10.1093/brain/awv256>
- Pietra, G., Manzini, C., Rivara, S., Vitale, M., Cantoni, C., Petretto, A., ... Mingari, M. C. (2012). Melanoma Cells Inhibit Natural Killer Cell Function by Modulating the Expression of Activating Receptors and Cytolytic Activity. *Cancer Research*, *72*(6), 1407–1415. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2544>
- Pignon, J.-C., Jegede, O., Shukla, S. A., Braun, D. A., Horak, C. E., Wind-Rotolo, M., ... Signoretti, S. (2019). irRECIST for the Evaluation of Candidate Biomarkers of Response to Nivolumab in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Analysis of a Phase II Prospective Clinical Trial. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3206>
- Pinkoski, M. J., Hobman, M., Heibein, J. A., Tomaselli, K., Li, F., Seth, P., ... Bleackley, R. C. (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood Journal*, *92*(3), 1044–1054. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/92/3/1044.full.pdf?sso-checked=true>
- Prasad, D. V. R., Richards, S., Mai, X. M., & Dong, C. (2003). B7S1 , a Novel B7 Family Member that Negatively Regulates T Cell Activation. *Immunity*, *18*, 863–873.
- Prevost-Blondel, A., Roth, E., Rosenthal, F. M., & Pircher, H. (2000). Crucial Role of TNF- in CD8 T Cell-Mediated Elimination of 3LL-A9 Lewis Lung Carcinoma Cells In Vivo. *The Journal of Immunology*, *164*(7), 3645–3651. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3645>
- Probst, H. C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T., & Broek, M. Van Den. (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8 + T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature Immunology*, *6*(3), 280–286. <https://doi.org/10.1038/ni1165>
- Qian, X., Rojas-villarraga, A., Sun, C., Can, C., Matsuda, K., Shen, N., ... Nath, S. K. (2010). Original article Non-synonymous variant ( Gly307Ser ) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatology*, (March), 1239–1244. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep470>
- Qiu, Z., Zhang, K., Qiu, X., Zhou, M., & Li, W. (2013). CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases : A meta-analysis. *Human Immunology*, *74*(2), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.10.009>
- Raab, M., Cai, Y., Bunnelli, S. C., Heyeck, S. D., Bergt, L. J., & Rudd, C. E. (1995). p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T for T-cell costimulation cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: Implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(September), 8891–8895.
- Ralston, K. J., Hird, S. L., Zhang, X., Scott, J. L., Jin, B., Thorne, R. F., ... Burns, G. F. (2004). The LFA-1-associated molecule PTA-1 (CD226) on T cells forms a dynamic molecular complex with protein 4.1G and human discs large. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(32), 33816–33828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401040200>

- Ramirez-Montagut, T., van den Brink, M. R. M., Kochman, A. A., Houghton, A. N., Chow, A., Hirschhorn-Cymerman, D., ... Miles, R. C. (2006). Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Family Related Gene Activation Overcomes Tolerance/Ignorance to Melanoma Differentiation Antigens and Enhances Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, *176*(11), 6434–6442. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6434>
- Ramsbottom, K. M., Hawkins, E. D., Shimoni, R., McGrath, M., Chan, C. J., Russell, S. M., ... Oliaro, J. (2014). Cutting Edge: DNAX Accessory Molecule 1-Deficient CD8+ T Cells Display Immunological Synapse Defects That Impair Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, *192*(2), 553–557. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302197>
- Redmond, W. L., Weinberg, A. D., Charbonneau, B., Gough, M. J., & Ratliff, T. L. (2007). Defects in the Acquisition of CD8 T Cell Effector Function after Priming with Tumor or Soluble Antigen Can Be Overcome by the Addition of an OX40 Agonist. *The Journal of Immunology*, *179*(11), 7244–7253. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7244>
- Remark, R., Alifano, M., Cremer, I., Lupo, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Riquet, M., ... Damotte, D. (2013). Characteristics and Clinical Impacts of the Immune Environments in Colorectal and Renal Cell Carcinoma Lung Metastases: Influence of Tumor Origin. *Clinical Cancer Research*, *19*(15), 4079 LP-4091. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3847>
- Restifo, N. P., Marincola, F. M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., John, R., & Rosenberg, S. A. (1996). Loss of Functional Beta2 -Microglobulin in Metastatic Melanomas From Five Patients Receiving Immunotherapy. *Journal National Cancer Institute*, *88*(2), 100–108.
- Riley, J. L., Blair, P. J., Musser, J. T., Abe, R., Tezuka, K., Tsuji, T., ... June, C. H. (2001). ICOS Costimulation Requires IL-2 and Can Be Prevented by CTLA-4 Engagement. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.8.4943>
- Ritter, A. T., Asano, Y., Lippincott-schwartz, J., Griffiths, G. M., Ritter, A. T., Asano, Y., ... Chen, B. (2015). Actin Depletion Initiates Events Leading to Granule Secretion at the Immunological Synapse Article Actin Depletion Initiates Events Leading to Granule Secretion at the Immunological Synapse. *Immunity*, *42*(5), 864–876. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.013>
- Rodig, N., Ryan, T., Allen, J. A., Pang, H., Grabie, N., Greenfield, E. A., ... Freeman, G. J. (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down- regulates CD8 + T cell activation and cytolysis. *European Journal of Immunology*, *31*17–3126. <https://doi.org/10.1002/eji.200324270>
- Rodriguez-ruiz, M. E., & Melero, I. (2017). Anti-CD137 and PD-1 / PD-L1 Antibodies En Route toward Clinical Synergy. *Clinical Cancer Research*, *23*(18), 5326–5329. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1799>
- Roman, A., Lutzky, V. P., Mittal, D., Li, X., Stannard, K., Teng, M. W. L., ... Smyth, M. J. (2018). CD96 targeted antibodies need not block CD96-CD155 interactions to promote NK cell anti-metastatic activity. *OncImmunity*, *7*(5). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1424677>
- Ronchetti, S., Bianchini, R., Bruscoli, S., Nocentini, G., Riccardi, C., Agostini, M., ... Ayroldi, E. (2004). GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *European Journal of Immunology*, *34*(3), 613–622. <https://doi.org/10.1002/eji.200324804>
- Rubtsov, Y. P., & Rudensky, A. Y. (2007). TGF $\beta$  signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nature Reviews Immunology*, *7*, 443. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nri2095>

- Rudd, C. E. (2008). The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nature*, 8(february), 153–160.
- Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological Reviews*, 229(1), 12–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x.CD28>
- Rutishauser, R. L., Martins, G. A., Kalachikov, S., Chandele, A., Ian, A., Meffre, E., ... Kaech, S. M. (2009). Blimp-1 promotes terminal differentiation of virus-specific CD8 T cells and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity*, 31(2), 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.014.Blimp-1>
- Sabbagh, L., Pulle, G., Liu, Y., Erdyni, N., Watts, T. H., Sabbagh, L., ... Watts, T. H. (2008). ERK-Dependent Bim Modulation Downstream of the 4-1BB-TRAF1 Signaling Axis Is a Critical Mediator of CD8 T Cell Survival In Vivo. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.8093>
- Sakisaka, T., & Takai, Y. (2004). Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(5), 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.007>
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., & Anderson, A. C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 207(10), 2187–2194. <https://doi.org/10.1084/jem.20100643>
- Salama, A. D., Imitola, J., Khoury, S. J., Ansari, M. J. I., Yagita, H., Tushima, F., ... Akiba, H. (2003). Critical Role of the Programmed Death-1 (PD-1) Pathway in Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(1), 71–78. <https://doi.org/10.1084/jem.20022119>
- Saleh, K. A. L., Abd, N., Aziz, E. L., Ali, A., Abozeed, W., Abd, A., ... Nabholtz, J. M. (2017). Predictive and prognostic significance of CD8 + tumor - infiltrating lymphocytes in patients with luminal B / HER 2 negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncology Letters*, 337–344. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6144>
- Salih, H. R., Kosowski, S. G., Haluska, V. F., Starling, G. C., Loo, D. T., Lee, F., ... Kiener, P. A. (2000). Constitutive Expression of Functional 4-1BB (CD137) Ligand on Carcinoma Cells. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2903–2910. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2903>
- Sallusto, F., Lenig, D., & Förster, R. (1999). Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions . *Nature* . *Nature*.
- Sanchez-lockhart, M., Graf, B., Miller, J., Sanchez-lockhart, M., Graf, B., & Miller, J. (2008). Signals and Sequences That Control CD28 Localization to the Central Region of the Immunological Synapse. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.11.7639>
- Sanchez-Lockhart, M., Kim, M., & Miller, J. (2011). Cutting Edge: A Role for Inside-Out Signaling in TCR Regulation of CD28 Ligand Binding. *The Journal of Immunology*, 187(11), 5515–5519. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102497>
- Sanchez-Lockhart, M., Rojas, A. V., Fettis, M. M., Bauserman, R., Higa, T. R., Miao, H., ... Miller, J. (2014). T cell receptor signaling can directly enhance the avidity of CD28 ligand binding. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089263>
- Saoulli, B. K., Lee, S. Y., Cannons, J. L., Yeh, W. C., Santana, A., Goldstein, M. D., ... Watts, T. H. (1998). CD28-independent, TRAF2-dependent Costimulation of Resting T Cells by 4-1BB Ligand. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(11).

- Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W. N., Konieczny, B. T., Subramaniam, S., & Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *Journal of Experimental Medicine*, 205(3), 625–640. <https://doi.org/10.1084/jem.20071641>
- Sata, M., & Walsh, K. (1998). TNF $\alpha$  regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation Masataka. *Nature Medicine*, 4(4), 415–420.
- Sato, T., Terai, M., Tamura, Y., Alexeev, V., Mastrangelo, M. J., & Selvan, S. R. (2011). Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunologic Research*, 51(2), 170–182. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8262-6>
- Savina, A., & Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews*, 219(1), 143–156. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x>
- Schadendorf, D., Hodi, F. S., Robert, C., Weber, J. S., Margolin, K., Hamid, O., ... Wolchok, J. D. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(17), 1889–1894. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2736>
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., & Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nature Immunology*, 1(5).
- Schneider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, B. H., Rush, C., Brewer, J. M., ... Rudd, C. E. (2006). Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4. *Science*, 313(September), 1972–1976.
- Schneider, H., & Rudd, C. E. (2008). CD28 and Grb-2, relative to Gads or Grap, preferentially co-operate with Vav1 in the activation of NFAT/AP-1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun*, 369(2), 616–621. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.068>
- Schneider, H., Smith, X., Liu, H., Bismuth, G., & Rudd, C. E. (2008). CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *European Journal of Immunology*, 38(1), 40–47. <https://doi.org/10.1002/eji.200737423>
- Segal, N. H., Logan, T. F., Hodi, F. S., Mcdermott, D., Melero, I., Hamid, O., ... Gangadhar, T. C. (2017). Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. *Clinical Cancer Research*, 1929–1937. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>
- Sen, D. R., Kaminski, J., Barnitz, R. A., Kurachi, M., Gerdemann, U., Yates, K. B., ... Wherry, E. J. (2016). The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science*, 354(6316).
- Seo, S. K., Choi, J. H., Kim, Y. H., Kang, W. J., Park, H. Y., Suh, J. H., ... Kwon, B. S. (2004). 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nature Medicine*, 10(10), 1088–1094. <https://doi.org/10.1038/nm1107>
- Seth, S., Georgoudaki, A.-M., Chambers, B. J., Qiu, Q., Kremmer, E., Maier, M. K., ... Bernhardt, G. (2009). Heterogeneous expression of the adhesion receptor CD226 on murine NK and T cells and its function in NK-mediated killing of immature dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(1), 91–101. <https://doi.org/10.1189/jlb.1208745>
- Seth, S., Maier, M. K., Qiu, Q., Ravens, I., Kremmer, E., Förster, R., & Bernhardt, G. (2007). The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(4), 959–965. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.102>

- Seth, S., Qiu, Q., Danisch, S., Maier, M. K., Braun, A., Ravens, I., ... Bernhardt, G. (2011). Intranodal Interaction with Dendritic Cells Dynamically Regulates Surface Expression of the Co-stimulatory Receptor CD226 Protein on Murine T Cells \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(45), 39153–39163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.264697>
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107–1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>
- Shao, Z., & Schwarz, H. (2011). CD137 ligand , a member of the tumor necrosis factor family , regulates immune responses via reverse signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(January), 21–29. <https://doi.org/10.1189/jlb.0510315>
- Sherman, E., Barr, V., Manley, S., Patterson, G., Balagopalan, L., Akpan, I., ... Samelson, L. E. (2011). Functional Nanoscale Organization of Signaling Molecules Downstream of the T Cell Antigen Receptor. *Immunity*, 35(5), 705–720. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.004>
- Sherrington, P. D., Scott, J. L., Jin, B., Simmons, D., Dorahy, D. J., Lloyd, J., ... Burns, G. F. (1997). TLISA1 (PTA1) activation antigen implicated in T cell differentiation and platelet activation is a member of the immunoglobulin superfamily exhibiting distinctive regulation of expression. *Journal of Biological Chemistry*, 272(35), 21735–21744. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.21735>
- Shevach, E. M. (2018). CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews Immunology*, 2(6), 389–400. <https://doi.org/10.1038/nri821>
- Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanashan, T., ... Phillips, J. H. (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*, 4(6), 573–581. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)70060-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)70060-4)
- Shibuya, A., Lanier, L. L., & Phillips, J. H. (1998). Protein kinase C is involved in the regulation of both signaling and adhesion mediated by DNAX accessory molecule-1 receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(4), 1671–1676. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712030>
- Shibuya, K., Lanier, L. L., Phillips, J. H., Ochs, H. D., Shimizu, K., Nakayama, E., ... Shibuya, A. (1999). Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity*, 11(5), 615–623. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80136-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80136-3)
- Shibuya, K., Shirakawa, J., Kameyama, T., Honda, S., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., ... Shibuya, A. (2003). CD226 (DNAM-1) Is Involved in Lymphocyte Function-associated Antigen 1 Costimulatory Signal for Naive T Cell Differentiation and Proliferation. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1829–1839. <https://doi.org/10.1084/jem.20030958>
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., & Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunology*, 3(2), 135–142. <https://doi.org/10.1038/ni759>
- Shin, H., Blackburn, S. D., Intlekofer, A. M., Kao, C., Jill, M., Reiner, S. L., & Wherry, E. J. (2009). A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*, 31(2), 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.019.A>
- Shirakawa, J., Shibuya, K., & Shibuya, A. (2004). Requirement of the serine at residue 329 for lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226). *International Immunology*, 17(3), 217–223. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh199>

- Shirakawa, J., Wang, Y., Shibuya, K., Honda, S., Shirakawa, J., Tahara-Hanaoka, S., & Shibuya, A. (2006). LFA-1-dependent lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226) in CD4<sup>+</sup> T cell. *International Immunology*, *18*(6), 951–957. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl031>
- Shrikant, P., Khoruts, A., & Mescher, M. F. (1999). CTLA-4 Blockade Reverses CD8<sup>+</sup> T Cell Tolerance to Tumor by a CD4<sup>+</sup> T Cell – and IL-2-Dependent Mechanism. *Immunity*, *11*, 483–493.
- Shuford, B. W. W., Klussman, K., Tritchler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., ... Mittler, R. S. (1997). 4-1BB Costimulatory Signals Preferentially Induce CD8<sup>+</sup> T Cell Proliferation and Lead to the Amplification In Vivo of Cytotoxic T Cell Responses. *The Journal of Experimental Medicine*, *186*(1).
- Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Marraco, S. A. F., Calderon-copete, S., Ferreira, D. P., ... Held, W. (2019). Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8<sup>+</sup> T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity*, *50*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.021>
- Sloan, K. E., Eustace, B. K., Stewart, J. K., Zehetmeier, C., Torella, C., Simeone, M., ... Jay, D. G. (2004). CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer*, *4*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-4-73>
- Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Zerafa, N., Cretney, E., Swann, J., & Yokoyama, W. M. (2005). NKG2D function protects the host from tumor initiation. *The Journal of Experimental Medicine*, *202*(5), 583–588. <https://doi.org/10.1084/jem.20050994>
- Smyth, M. J., Kelly, J. M., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Degli-Esposti, M. A., ... Westwood, J. A. (2004). Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*, *42*(4), 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034>
- Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., MacGregor, D., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(5), 755–760. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974040> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2193269>
- Song, C., Sadashivaiah, K., Furusawa, A., Davila, E., Tamada, K., & Banerjee, A. (2014). Eomesodermin is required for antitumor immunity mediated by 4-1BB-agonist immunotherapy. *Oncot Immunology*, (January), 2–11.
- Soriani, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Lannitto, M. L., Ricciardi, M. R., Gialleonardo, V. Di, ... Santoni, A. (2009). ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood*, *113*(15), 3503–3511. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-173914>
- Sotomayor, E. M., Borrello, I., Tubb, E., Allison, J. P., & Levitsky, H. I. (1999). In vivo blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(20), 11476–11481. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11476>
- Speiser, D. E., Miranda, R., Zakarian, A., Bachmann, M. F., McKall-Faienza, K., Odermatt, B., ... Ohashi, P. S. (1997). Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *The Journal of Experimental Medicine*, *186*(5), 645–653. <https://doi.org/10.1084/jem.186.5.645>
- Stamper, C. C., Zhang, Y., Tobin, J. F., Erbe, D. V., Ikemizu, S., Davis, S. J., ... Mosyak, L. (2001). Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature*, *410*, 608. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/35069118>



- Stanietsky, N., Rovis, T. L., Glasner, A., Seidel, E., Tsukerman, P., Yamin, R., ... Mandelboim, O. (2013). Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR. *European Journal of Immunology*, *43*(8), 2138–2150. <https://doi.org/10.1002/eji.201243072>
- Stanietsky, N., Simic, H., Arapovic, J., Toporik, A., Levy, O., Novik, A., ... Mandelboim, O. (2009). The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(42), 17858–17863. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903474106>
- Stannard, K. A., Waterhouse, N. J., Vari, F., Chatenoud, L., & Gandhi, M. K. (2019). Human peripheral blood DNAM-1 neg NK cells are a terminally differentiated subset with limited effector functions, *3*(11). <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018030676>
- Steinbuck, M. P., & Winandy, S. (2018). A Review of Notch Processing With New Insights Into Ligand-Independent Notch Signaling in T-Cells. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1230. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01230>
- Steinert, E. M., Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Beura, L. K., Manlove, L. S., Igyártó, B. Z., ... Masopust, D. (2015). Quantifying Memory CD8<sup>+</sup>T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance. *Cell*, *161*(4), 737–749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.031>
- Stengel, K. F., Harden-Bowles, K., Yu, X., Rouge, L., Yin, J., Comps-Agrar, L., ... Grogan, J. L. (2012). Structure of TIGIT immunoreceptor bound to poliovirus receptor reveals a cell-cell adhesion and signaling mechanism that requires cis-trans receptor clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(14), 5399–5404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120606109>
- Stephens, G. L., Collins, M., Shevach, E. M., Carreno, B. M., McHugh, R. S., Young, D. A., ... Whitters, M. J. (2004). Engagement of Glucocorticoid-Induced TNFR Family-Related Receptor on Effector T Cells by its Ligand Mediates Resistance to Suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology*, *173*(8), 5008–5020. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.8.5008>
- Strasser, A., Jost, P. J., & Nagata, S. (2009). The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity*, *30*(2), 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.001>
- Street, S. E. A., Cretney, E., & Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon- $\gamma$  activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, *97*(1), 192–197. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.1.192>
- Strioga, M., Pasukoniene, V., & Characiejus, D. (2011). CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T cells and their role in health and disease. *Immunology*, *134*(1), 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x>
- Strome, S. E., Dong, H., Tamura, H., Voss, S. G., Flies, D. B., Tamada, K., ... Chen, L. (2003). B7-H1 Blockade Augments Adoptive T-Cell Immunotherapy for Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, *63*(11), 6501–6505.
- Sun, J. C., Williams, M. A., & Bevan, M. J. (2004). CD4<sup>+</sup> T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8<sup>+</sup> T cells after acute infection. *Nature Immunology*, *5*(9), 927–933. <https://doi.org/10.1038/ni1105>
- Sun, Y., Chen, H. M., Subudhi, S. K., Chen, J., Koka, R., Chen, L., & Fu, Y.-X. (2002). Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease. *Nature Medicine*, *8*(12), 1405–1413. <https://doi.org/10.1038/nm1202-796>

- Sun, Y., Lin, X., Chen, H. M., Wu, Q., Subudhi, S. K., Chen, L., & Fu, Y.-X. (2002). Administration of Agonistic Anti-4-1BB Monoclonal Antibody Leads to the Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, *168*(3), 1457–1465. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1457>
- Sznol, M., Hodi, F. S., Margolin, K., McDermott, D. F., Ernstoff, M. S., Kirkwood, J. M., ... Logan, T. (2008). Phase I study of BMS-663513, a fully human anti-CD137 agonist monoclonal antibody, in patients (pts) with advanced cancer (CA). *Journal of Clinical Oncology*, *26*(15\_suppl), 3007. [https://doi.org/10.1200/jco.2008.26.15\\_suppl.3007](https://doi.org/10.1200/jco.2008.26.15_suppl.3007)
- Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Kai, H., Miyamoto, A., Morikawa, Y., Ohkochi, N., ... Shibuya, A. (2006). Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood*, *107*(4), 1491–1496. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1684>
- Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Onoda, Y., Zhang, H., Yamazaki, S., Miyamoto, A., ... Shibuya, A. (2004). Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *International Immunology*, *16*(4), 533–538. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh059>
- Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., & Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*, 603. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrm2457>
- Takemoto, N., Intlekofer, A. M., John, T., Wherry, E. J., & Reiner, S. L. (2006). Cutting Edge: IL-12 Inversely Regulates T-bet and Eomesodermin Expression during Pathogen-Induced CD8 + T Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7515>
- Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., ... Nagata, S. (1996). Fas ligand in human serum. *Nature Medicine*, *2*(3), 317–322. <https://doi.org/10.1038/nm0396-317>
- Tang-Huau, T.-L., Gueguen, P., Goudot, C., Durand, M., Bohec, M., Baulande, S., ... Segura, E. (2018). Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway. *Nature Communications*, *9*(1), 2570. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04985-0>
- Tavano, R., Contento, R. L., Baranda, S. J., Soligo, M., Tuosto, L., Manes, S., & Viola, A. (2006). CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nature Cell Biology*, *8*(11). <https://doi.org/10.1038/ncb1492>
- Thommen, D. S., Koelzer, V. H., Herzig, P., Roller, A., Trefny, M., Dimeloe, S., ... Zippelius, A. (2018). A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nature Medicine*, *24*(7), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0057-z>
- Thommen, D. S., Schreiner, J., Muller, P., Herzig, P., Roller, A., Belousov, A., ... Zippelius, A. (2015). Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer Immunology Research*, *3*(12), 1344–1355. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0097>
- Thurner, B., Schuler, G., Enk, A., Röder, C., von den Driesch, P., Bender, A., ... Dieckmann, D. (1999). Vaccination with Mage-3a1 Peptide–Pulsed Mature, Monocyte-Derived Dendritic Cells Expands Specific Cytotoxic T Cells and Induces Regression of Some Metastases in Advanced Stage IV Melanoma. *The Journal of Experimental Medicine*, *190*(11), 1669–1678. <https://doi.org/10.1084/jem.190.11.1669>

- Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Bluestone, J. A., & Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 Leads to Massive Lymphoproliferation and Fatal Multiorgan Tissue Destruction , Revealing a Critical Negative Regulatory Role of CTLA-4. *Immunity*, *3*, 541–547.
- Tivol, E. A., Boyd, S. D., McKeon, S., Borriello, F., Nickerson, P., Strom, T. B., & Sharpe, A. H. (1997). CTLA4lg prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. *The Journal of Immunology*, *158*(11), 5091 LP-5094. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/158/11/5091.abstract>
- Trevejo, J. M., Marino, M. W., Philpott, N., Josien, R., Richards, E. C., Elkon, K. B., & Falck-pedersen, E. (2001). TNF-alpha-dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Triki, H., Charfi, S., Bouzidi, L., Ben Kridis, W., Daoud, J., Chaabane, K., ... Cherif, B. (2019). CD155 expression in human breast cancer: Clinical significance and relevance to natural killer cell infiltration. *Life Sciences*, *231*, 116543. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116543>
- Tripathi, P., Kurtulus, S., Wojciechowski, S., Sholl, A., Hoebe, K., Morris, S. C., ... Hildeman, D. A. (2010). STAT5 IS CRITICAL TO MAINTAIN EFFECTOR CD8+ T CELL RESPONSES. *The Journal of Immunology*, *185*(4), 2116–2124. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000842>.STAT5
- Umansky, V., & Sevko, A. (2013). Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Microenvironment*, *6*(2), 169–177. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0126-7>
- Utzschneider, D. T., Charmoy, M., Chennupati, V., Pousse, L., Ferreira, D. P., Calderon-Copete, S., ... Held, W. (2016). T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8+T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity*, *45*(2), 415–427. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.021>
- Van Den Eynde, B. J., & Van Der Bruggen, P. (1997). T cell defined tumor antigens. *Current Opinion in Immunology*, *9*(5), 684–693. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(97\)80050-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(97)80050-7)
- Van Der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van Den Eynde, B., ... Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, *254*(5038), 1643–1647. <https://doi.org/10.1126/science.1840703>
- Verdeil, G., Nguyen, C., Auphan-Anezin, N., Schmitt-Verhulst, A.-M., & Puthier, D. (2006). STAT5-Mediated Signals Sustain a TCR-Initiated Gene Expression Program toward Differentiation of CD8 T Cell Effectors. *The Journal of Immunology*, *176*(8), 4834–4842. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4834>
- Vetto, J. T., Lum, S., Morris, A., Sicotte, M., Lemon, M., & Weinberg, A. (1997). Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers. *The American Journal of Surgery*.
- Vitale, M., Chiesa, M. Della, Carlomagno, S., Pende, D., Aricò, M., Moretta, L., & Moretta, A. (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  released upon engagement of the NKP30 triggering receptor. *Blood*, *106*(2), 566–571. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4035>
- Vitale, M., Zimmer, J., Castriconi, R., Hanau, D., Donato, L., Bottino, C., ... Moretta, A. (2002). Analysis of natural killer cells in TAP2-deficient patients: Expression of functional triggering receptors and evidence for the existence of inhibitory receptor(s) that prevent lysis of normal autologous cells. *Blood*, *99*(5), 1723–1729. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.5.1723>

- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, *9*(5), 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Voehringer, D., Blaser, C., Brawand, P., Raulet, H., Hanke, T., Pircher, H., ... Hanke, T. (2001). Viral Infections Induce Abundant Numbers of Senescent CD8 T Cells. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.4838>
- Wagner, A. K., Kadri, N., Snäll, J., Brodin, P., Gilfillan, S., Colonna, M., ... Chambers, B. J. (2017). Expression of CD226 is associated to but not required for NK cell education. *Nature Communications*, *8*(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms15627>
- Walunas, B. T. L., Christina, Y. B., & Bluestone, J. A. (1996). CTLA-4 Ligation Blocks CD28-dependent T Cell Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(June).
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L., & Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells:  $\{\text{left}\}\cup\{\text{right}\}$  fait la force  $\{\text{right}\}$ . *Blood*, *106*(7), 2252–2258. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1154>
- Wan, Z., Shao, X., Ji, X., Dong, L., Wei, J., Xiong, Z., ... Qi, H. (2018). Transmembrane domain-mediated Lck association underlies bystander and costimulatory ICOS signaling. *Cellular & Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0183-z>
- Wang, B., Zhang, W., Jankovic, V., Golubov, J., Poon, P., Oswald, E. M., ... Skokos, D. (2018). Combination cancer immunotherapy targeting PD-1 and GTR can rescue CD8 + T cell dysfunction and maintain memory phenotype. *Science Immunology*, 1–14.
- Wang, H., Franco, F., & Ho, P.-C. (2017). Metabolic Regulation of Tregs in Cancer: Opportunities for Immunotherapy. *Trends in Cancer*, *3*(8), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.06.005>
- Wang, P. L., O'Farrell, S., Clayberger, C., & Krensky, A. M. (1992). Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *The Journal of Immunology*, *148*(8), 2600–2608. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/148/8/2600>
- Wang, Q., Zhang, P., Zhang, Q., Wang, X., Li, J., Ma, C., ... Zhang, L. (2008). Analysis of CD137 and CD137L Expression in Human Primary Tumor Tissues. *Croatian Medical Journal*, *49*(2), 192–200. <https://doi.org/10.3325/cmj.2008.2.192>
- Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., ... Mak, T. W. (1995). Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctl $\alpha$ -4 B C-. *Science*, *270*(NOVEMBER).
- Weinberg, A. D., Ramstad, T., Shields, J., Alvord, G., Urba, W. J., Bunce, C., ... Vetto, J. T. (2000). Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, *164*(4), 2160–2169. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.2160>
- Wen, T., Bukczynski, J., & Watts, T. H. (2002). 4-1BB Ligand-Mediated Costimulation of Human T Cells Induces CD4 and CD8 T Cell Expansion, Cytokine Production, and the Development of Cytolytic Effector Function. *The Journal of Immunology*, *168*(10), 4897–4906. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.4897>
- Wherry, E. J., Ha, S. J., Kaech, S. M., Haining, W. N., Sarkar, S., Kalia, V., ... Ahmed, R. (2007). Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity*, *27*(4), 670–684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>

- Wherry, J. E., & Ahmed, R. (2003). Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *Journal of Virology*, 77(8), 1–6. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.8.4911>
- Whitmire, J. K., Eam, B., Benning, N., Whitton, L., Whitmire, J. K., Eam, B., ... Whitton, J. L. (2007). Direct Interferon- $\gamma$  Signaling Dramatically Enhances CD4 + and CD8 + T Cell Memory. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1190>
- Whitmire, J. K., Tan, J. T., & Whitton, J. L. (2005). Interferon- $\gamma$  acts directly on CD8 + T cells to increase their abundance during virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(7), 1053–1059. <https://doi.org/10.1084/jem.20041463>
- Wilcox, R. A., Flies, D. B., Zhu, G., Johnson, A. J., Tamada, K., Chapoval, A. I., ... Chen, L. (2002). Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(5), 651–659. <https://doi.org/10.1172/JCI200214184.Introduction>
- Wilke, C. M., Bishop, K., Fox, D., & Zou, W. (2011). Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in Immunology*, 32(12), 603–611. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.08.003>
- Williams, M. A., & Bevan, M. J. (2007). Effector and Memory CTL Differentiation. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548>
- Williams, M. A., Tzgnik, A. J., & Bevan, M. J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*, 441(7095), 890–893. <https://doi.org/10.1038/nature04790>
- Willinger, T., Freeman, T., Hasegawa, H., McMichael, A. J., & Callan, M. F. C. (2005). Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets. *The Journal of Immunology*, 175(9), 5895–5903. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5895>
- Willoughby, J. E., Kerr, J. P., Rogel, A., Taraban, Y., Buchan, S. L., Johnson, P. W. M., ... Al-shamkhani, A. (2014). Differential Impact of CD27 and 4-1BB Costimulation on Effector and Memory CD8 T Cell Generation following Peptide Immunization. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301217>
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., ... Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3 + Regulatory T Cell Function. *Science*, (October), 271–276.
- Wolchok, J. D., Kluger, H., Callahan, M. K., Postow, M. A., Rizvi, N. A., Lesokhin, A. M., ... Sznol, M. (2013). Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 369(2), 122–133. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1302369>
- Woo, S., Turnis, M. E., Goldberg, M. V, Bankoti, J., Nirschl, C. J., Bettini, M. L., ... Alan, J. (2013). Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Research*, 72(4), 917–927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1620.Immune>
- Wu, H., Gong, J., & Liu, Y. (2018). Indoleamine 2, 3-dioxygenase regulation of immune response (Review). *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 4867–4873. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8537>
- Wu, T., Ji, Y., Moseman, E. A., Xu, H. C., Manglani, M., Kirby, M., ... Schwartzberg, P. L. (2016). The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Science Immunology*, 1(6), eaai8593. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aai8593>

- Xiao, Z., Casey, K. A., Jameson, S. C., Curtsinger, J. M., & Matthew, F. (2009). Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or Type I IFN. *The Journal of Immunology*, *182*(5), 612–626. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803484>.Programming
- Xu, D., Gu, P., Pan, P.-Y., Li, Q., Sato, A. I., & Chen, S.-H. (2004). NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *International Journal of Cancer*, *109*(4), 499–506. <https://doi.org/10.1002/ijc.11696>
- Xu, X., Tan, Y., Qian, Y., Xue, W., Wang, Y., Du, J., ... Ding, W. (2019). Clinicopathologic and prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ T cells in patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine*, *98*(2), e13923. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013923>
- Yang, Y., Zou, J., Mu, J., Wijesuriya, R., Ono, S., Walunas, T., ... Hamaoka, T. (1997). Enhanced Induction of Antitumor T-Cell Responses by Cytotoxic T Lymphocyte associated Blockade : The Effect Is Manifested Only at the Restricted Tumor-bearing Stages1. *Cancer Research*, *40*36–4041.
- Ye, Q., Song, D.-G., Poussin, M., Yamamoto, T., Best, A., Li, C., ... Powell, D. J. (2014). CD137 Accurately Identifies and Enriches for Naturally Occurring Tumor-Reactive T Cells in Tumor. *Clinical Cancer Research*, *20*(1), 44–55. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0945>
- Yoshida, K., Sakamoto, A., Yamashita, K., Arguni, E., Horigome, S., Arima, M., ... Tokuhisa, T. (2006). Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8+ T cells. *European Journal of Immunology*, *31*46–3156. <https://doi.org/10.1002/eji.200636165>
- Yu, X., Harden, K., Gonzalez, L. C., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., ... Grogan, J. L. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology*, *10*(1), 48–57. <https://doi.org/10.1038/ni.1674>
- Yuan, J., Gnjjatic, S., Li, H., Powel, S., Gallardo, H. F., Ritter, E., ... Wolchok, J. D. (2008). CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(51), 1–6.
- Yue, F. Y., Dummer, R., Geertsen, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolio, S., & Burg, G. (1997). Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *International Journal of Cancer*, *71*(4), 630–637. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970516\)71:4<630::AID-IJC20>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970516)71:4<630::AID-IJC20>3.0.CO;2-E)
- Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J. D., Suresh, M., Altman, J. D., & Ahmed, R. (1998). Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *The Journal of Experimental Medicine*, *188*(12), 2205–2213. <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2205>
- Zamai, B. L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S., & Perussia, B. (1998). Natural Killer ( NK ) Cell – mediated Cytotoxicity : Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(12), 2375–2380.
- Zappasodi, R., Sirard, C., Li, Y., Budhu, S., Abu-Akeel, M., Liu, C., ... Merghoub, T. (2019). Rational design of anti-GITR-based combination immunotherapy. *Nature Medicine*, *25*(5), 759–766. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0420-8>
- Zhang, L., Rubin, S. C., Regnani, G., Katsaros, D., Liebman, M. N., Gimotty, P. A., ... Conejo-Garcia, J. R. (2003). Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, *348*(3), 203–213. <https://doi.org/10.1056/nejmoa020177>

- Zhang, Y., Huang, S., Gong, D., Qin, Y., & Shen, Q. (2010). Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cellular and Molecular Immunology*, (April), 389–395. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.28>
- Zhang, Z., Wu, N., Lu, Y., Davidson, D., Colonna, M., & Veillette, A. (2015). DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(12), 2165–2182. <https://doi.org/10.1084/jem.20150792>
- Zhao, X., Rong, L., Zhao, X., Li, X., Liu, X., Deng, J., ... Qin, Z. (2012). TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11). <https://doi.org/10.1172/JCI64115DS1>
- Zhao, Y., Niu, C., & Cui, J. (2018). Gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells: friend or foe in cancer development? *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1378-2>
- Zhu, C., Sakuishi, K., Xiao, S., Sun, Z., Zaghouani, S., Gu, G., ... Kuchroo, V. K. (2015). An IL-27/NFIL3 signalling axis drives Tim-3 and IL-10 expression and T-cell dysfunction. *Nature Communications*, 6, 6072. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ncomms7072>
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*, 28(1), 445–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>
- Zinselmeyer, B. H., Heydari, S., Sacristán, C., Nayak, D., Cammer, M., Herz, J., ... McGavern, D. B. (2013). PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(4), 757–774. <https://doi.org/10.1084/jem.20121416>
- Zippelius, A., Lubenow, N., Speiser, D., Cerottini, J.-C., Romero, P., Pittet, M. J., ... Rufer, N. (2004). Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Research*, 64(8), 2865–2873. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087405>
- Zou, W., Wolchok, J. D., & Chen, L. (2016). PD-L1 ( B7-H1 ) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy : Mechanisms , response biomarkers , and combinations. *Science Translational Medicine*, 8(328).

## V. ANNEXES

J'ai décidé de mettre en annexe de ce manuscrit de thèse des travaux publiés en 2018 auxquels j'ai contribué au cours de ma thèse. Ces travaux portent sur le rôle immunorégulateur de TIGIT sur les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup>, à la fois chez des patients atteints de myélome multiple (MM) et dans le modèle murin préclinique de la maladie VK\*MYC.



**blood**<sup>®</sup>

2018 132: 1689-1694

doi:10.1182/blood-2018-01-825265 originally published  
online July 9, 2018

### **TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8<sup>+</sup> T-cell immunity against multiple myeloma**

Camille Guillerey, Heidi Harjunpää, Nadège Carrié, Sahar Kassem, Tricia Teo, Kim Miles, Sophie Krumeich, Marianne Weulersse, Marine Cuisinier, Kimberley Stannard, Yuan Yu, Simone A. Minnie, Geoffrey R. Hill, William C. Dougall, Hervé Avet-Loiseau, Michele W. L. Teng, Kyohei Nakamura, Ludovic Martinet and Mark J. Smyth



## IMMUNOBIOLOGY AND IMMUNOTHERAPY

TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8<sup>+</sup> T-cell immunity against multiple myeloma

Camille Guillerey,<sup>1,2,\*</sup> Heidi Harjunpää,<sup>2,3,\*</sup> Nadège Carrié,<sup>4</sup> Sahar Kassem,<sup>4</sup> Tricia Teo,<sup>1,2</sup> Kim Miles,<sup>1</sup> Sophie Krumeich,<sup>1</sup> Marianne Weulersse,<sup>4</sup> Marine Cuisinier,<sup>4</sup> Kimberley Stannard,<sup>1</sup> Yuan Yu,<sup>1</sup> Simone A. Minnie,<sup>5</sup> Geoffrey R. Hill,<sup>5</sup> William C. Dougall,<sup>1</sup> Hervé Avet-Loiseau,<sup>4,6</sup> Michele W. L. Teng,<sup>2,3</sup> Kyohei Nakamura,<sup>1</sup> Ludovic Martinet,<sup>4,6,\*</sup> and Mark J. Smyth<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Immunology in Cancer and Infection Laboratory, QIMR Berghofer Medical Research Institute, <sup>2</sup>School of Medicine, The University of Queensland, and <sup>3</sup>Cancer Immunoregulation and Immunotherapy Laboratory, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, QLD, Australia; <sup>4</sup>Cancer Research Center of Toulouse, INSERM UMR 1037, Toulouse, France; <sup>5</sup>Bone Marrow Transplantation Cancer Laboratory, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, QLD, Australia; and <sup>6</sup>Institut Universitaire du Cancer, Toulouse, France

## KEY POINTS

- TIGIT expression is upregulated on CD8<sup>+</sup> T cells during MM progression and is associated with impaired effector functions.
- TIGIT deficiency or blockade protects mice against MM and improves effector functions of myeloma patient CD8<sup>+</sup> T cells.

**Immune-based therapies hold promise for the treatment of multiple myeloma (MM), but so far, immune checkpoint blockade targeting programmed cell death protein 1 has not proven effective as single agent in this disease. T-cell immunoglobulin and ITIM domains (TIGIT) is another immune checkpoint receptor known to negatively regulate T-cell functions. In this study, we investigated the therapeutic potential of TIGIT blockade to unleash immune responses against MM. We observed that, in both mice and humans, MM progression was associated with high levels of TIGIT expression on CD8<sup>+</sup> T cells. TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from MM patients exhibited a dysfunctional phenotype characterized by decreased proliferation and inability to produce cytokines in response to anti-CD3/CD28/CD2 or myeloma antigen stimulation. Moreover, when challenged with Vk\*MYC mouse MM cells, TIGIT-deficient mice showed decreased serum monoclonal immunoglobulin protein levels associated with reduced tumor burden and prolonged survival, indicating that TIGIT limits antimyeloma immune responses. Importantly, blocking TIGIT using monoclonal antibodies increased the effector function of MM patient CD8<sup>+</sup> T cells and suppressed MM development.**

**Altogether our data provide evidence for an immune-inhibitory role of TIGIT in MM and support the development of TIGIT-blocking strategies for the treatment of MM patients. (*Blood*. 2018;132(16):1689-1694)**

## Introduction

Multiple myeloma (MM) is a largely incurable hematological cancer characterized by the expansion of malignant plasma cells in the bone marrow (BM) that secrete circulating monoclonal immunoglobulin proteins (M-proteins).<sup>1</sup> Immunotherapies are now being explored in MM and bring hope for a potential cure.<sup>2</sup> Inhibitors of immune checkpoints have emerged as a powerful strategy to overcome tumor-induced immunosuppression.<sup>3</sup> In particular, monoclonal antibodies (mAbs) blocking programmed cell death protein 1 (PD-1)–programmed cell death ligand 1 interaction have shown significant clinical efficacy in a number of malignancies.<sup>4</sup> However, as a single agent, the anti-PD-1 mAb nivolumab failed to show efficacy in a cohort of 27 relapsed/refractory patients with MM,<sup>5</sup> indicating that additional immune checkpoints might restrain immune responses against MM.

T-cell immunoglobulin and ITIM domains (TIGIT) is an inhibitory molecule expressed on lymphocytes that competes with the activating receptor DNAX-accessory molecule 1 (CD226) and the inhibitory receptors CD96 and CD112R for the binding of CD155 and CD112.<sup>6,7</sup> TIGIT recently emerged as an attractive

target for cancer immunotherapy<sup>8,9</sup> and anti-TIGIT mAbs are currently being tested in phase 1 clinical trial in patients with advanced or metastatic tumors ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); NCT02794571). In this study, we investigated the therapeutic potential of targeting TIGIT in MM.

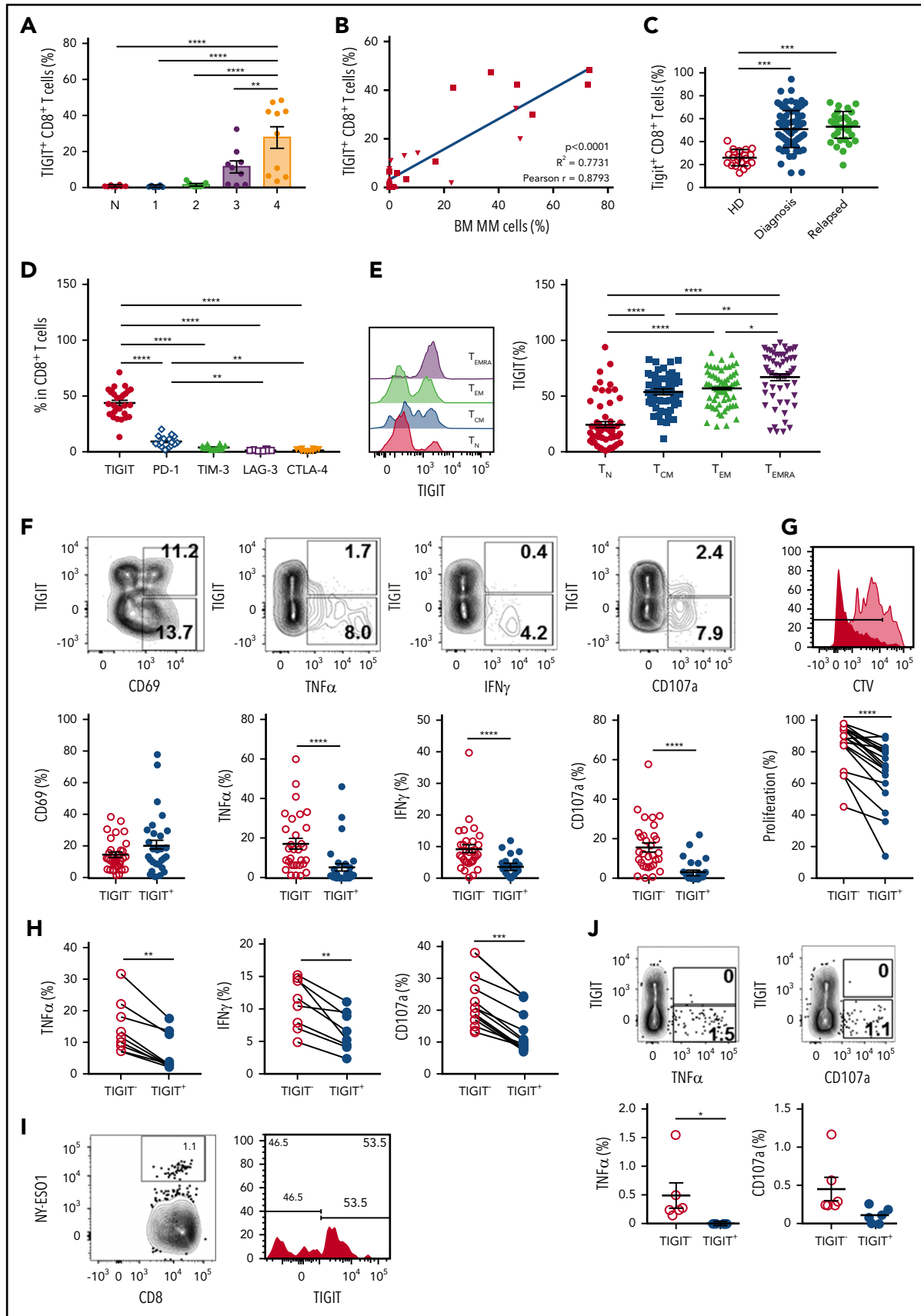
## Study design

## Mice

C57BL/6 wild-type (WT) mice were purchased from the Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research. C57BL/6 *Tigit*<sup>-/-</sup> mice<sup>10</sup> were kindly provided by Bristol-Myers Squibb. C57BL/KaLwRijHsd mice were kindly provided by Peter Croucher (Garvan Institute of Medical Research, Darlinghurst, Australia). Mice were bred and maintained at QIMR Berghofer Medical Research Institute and used when 8 to 20 weeks old. All experiments were approved by the QIMR Berghofer Medical Research Institute Animal Ethics Committee.

## Preclinical MM models

Experiments with Vk\*MYC MM cell lines<sup>11</sup> (Vk12653 and Vk12598) and a 5TGM1 MM cell line<sup>12</sup> were performed as previously



**Figure 1. TIGIT expression on CD8<sup>+</sup> T cells increases during MM development and is associated with decreased effector cell functions.** (A) TIGIT expression on BM CD8<sup>+</sup> T cells was analyzed by flow cytometry in naïve C57BL/6 WT mice (N) and 1, 2, 3, and 4 weeks after IV challenge with  $2 \times 10^4$  Vk12653 MM cells. Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of 2 pooled experiments with  $n = 6$  to 14 mice per group. (B) Percentages of BM TIGIT<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells from Vk12653-MM–challenged mice shown

described.<sup>13</sup> For some experiments, mice were treated with blocking anti-TIGIT mAbs (4B1, Bristol-Myers Squibb) and anti-PD-1 mAbs (RMP1-14; Bio X Cell) or depleting anti-CD8 $\beta$  mAbs (53-5.8; Bio X Cell), as indicated.

## MM patient samples

All patients gave written informed consent and collection was approved by Institut Universitaire du Cancer de Toulouse–Oncopole and the Centre Hospitalier Universitaire–Toulouse review boards. Fresh BM aspirates from patients with MM were collected at the time of diagnosis or relapse in the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse–Toulouse (France) were depleted of malignant plasma cells using anti-CD138-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, France). Fresh BM aspirates from healthy donors were purchased from Lonza.

## Human T-cell functional assays

CD138<sup>-</sup> BM cells or sorted CD8<sup>+</sup> T cells (MoFlo Astrios cell sorter, Beckman Coulter) were stimulated with anti-CD3/CD28/CD2 microbeads (T-cell activation/expansion kit, Miltenyi Biotec) or NY-ESO-1<sub>157-165</sub> analog (SLLMWITQA, Peptide 2.0 Inc, 1  $\mu$ g/mL) with or without anti-TIGIT blocking mAbs (10  $\mu$ g/mL, MBSA43, eBioscience). Intracellular cytokine staining was performed after 6 hours in the presence of antigen-presenting cell–conjugated anti-CD107a (H4A3, BD Biosciences) and GolgiPlug (BD Biosciences). Cytokine levels were measured in the cell culture supernatants by CBA (BD Biosciences) after 24 hours. Alternatively, cells were stained with Cell Trace Violet (CTV, Thermo Fisher Scientific) before anti-CD3/CD28/CD2 microbead stimulation followed by CTV dilution assessment 5 days later.

## Flow cytometry

Single-cell suspensions were stained according to standard protocols with previously described anti-mouse antibodies,<sup>13</sup> anti-mouse TIGIT (1G9), or anti-human CD3 (HIT3a), CD8 $\alpha$  (SK1), CD45RA (HI100), CD62L (DREG-56), CD69 (FN50), CD107a (H4A3), TIGIT (MBSA43), LAG-3 (3DS223H), PD1 (EH12.1), CTLA-4 (BNI3), Tim-3 (7D3), anti-interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  [B27]), or anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  [MAB11]). MM patient CD8<sup>+</sup> T cells were stained with phycoerythrin-labeled HLA-A2/NY-ESO-1<sub>157-165</sub> (SLLMWITQA) multimers as described previously.<sup>14</sup> Antibodies were purchased from eBioScience, BioLegend, or BD Biosciences. Data were collected with LSR Fortessa Flow Cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo (Tree Star).

## Statistics

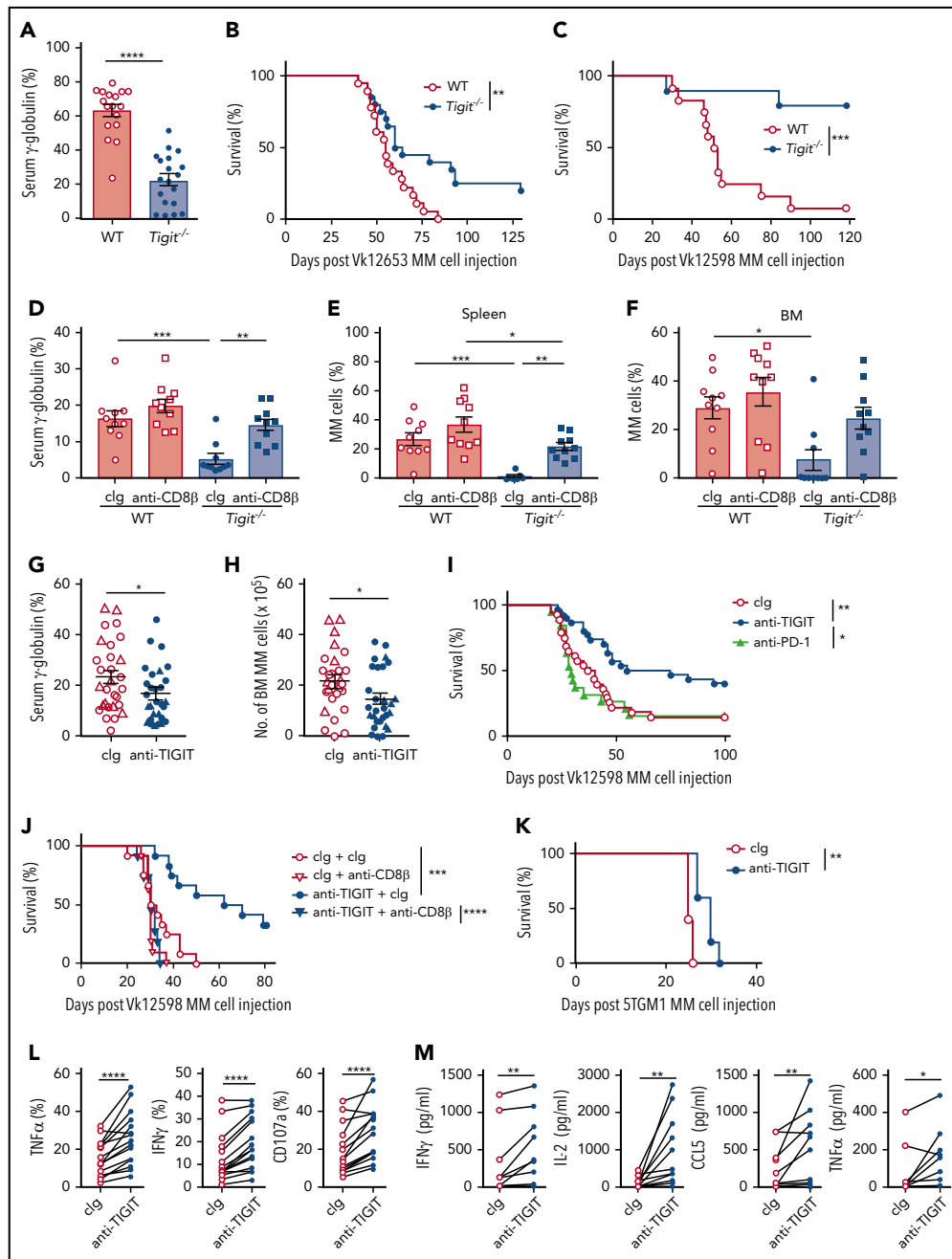
Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software using the indicated test. Data were considered to be statistically significant when  $P \leq .05$ .

## Results and discussion

First, we analyzed TIGIT expression on immune cells in C57BL/6 WT mice. Although TIGIT was undetectable on BM CD8<sup>+</sup> T cells in naïve mice, it was induced following challenge with Vk12653 MM cells and the percentages of TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells correlated with myeloma burden (Figure 1A-B). We also observed TIGIT expression on 30% to 40% of BM CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs in both naïve and MM-bearing mice, but TIGIT was undetectable on FoxP3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> effector T and natural killer cells (data not shown). BM CD8<sup>+</sup> T cells from newly diagnosed or relapsed patients with MM expressed higher levels of TIGIT than healthy donors (Figure 1C). By contrast, natural killer cells and CD4<sup>+</sup> T cells expressed moderate levels of TIGIT (data not shown). Compared with other inhibitory molecules, TIGIT was more frequently expressed on MM patient CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 1D), suggesting that TIGIT represents a major immune checkpoint in MM. TIGIT was preferentially expressed on memory CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 1E) and was associated with higher PD-1, CD244, and KLRG1 and lower CD226 expression (data not shown). Of note, no correlation was observed between TIGIT and other inhibitory receptors CD96, CD112R, LAG-3, CTLA-4, or Tim-3 or its ligands CD155 and CD112 on human MM cells (data not shown).<sup>15</sup> Altogether our observations suggest a role for TIGIT-CD155/CD112 interactions in MM pathology.

Next, we stimulated CD138<sup>-</sup> BM cells from patients with MM with anti-CD3/CD28/CD2 microbeads and compared effector functions of TIGIT<sup>+</sup> and TIGIT<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. Although CD69 expression revealed that both subsets were activated, TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells produced limited amounts of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  (Figure 1F). The terminally differentiated phenotype of TIGIT<sup>+</sup> T cells in patients with MM and their decreased capacity to produce cytokines were reminiscent of the features of exhausted TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells previously reported in patients with acute myeloid leukemia<sup>16</sup> However, in contrast with observations in acute myeloid leukemia,<sup>16</sup> MM patient TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells also exhibited decreased CD107a expression, indicating poor killing capability (Figure 1F) as well as reduced proliferative capacity (Figure 1G). Similar results were obtained when TIGIT<sup>+</sup> and TIGIT<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were sorted before stimulation, demonstrating that differences were not caused by modulation of TIGIT expression during the assay (Figure 1H). TIGIT<sup>+</sup> and TIGIT<sup>-</sup> populations were also present among

**Figure 1 (continued)** in panel A were plotted against percentages of BM MM cells in these mice. (C) Graphs showing the mean  $\pm$  standard deviation percentage of TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in BM CD8<sup>+</sup> T cells from healthy donors (HDs) (n = 20) and MM patients at diagnosis (n = 86) or after relapse (n = 32). (D) The expression of immune checkpoints was analyzed on MM patient BM CD8<sup>+</sup> T cells by flow cytometry. Graphs show mean  $\pm$  SEM from n = 16 to 26 patients with MM. (E) Representative histogram showing the expression of TIGIT on MM patient BM CD8<sup>+</sup> T-cell subsets T<sub>N</sub> (CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), T<sub>CM</sub> (CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), T<sub>EM</sub> (CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), and T<sub>EMRA</sub> (CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) and graph recapitulating the percentage of TIGIT<sup>+</sup> cells shown as mean  $\pm$  SEM from n = 59 MM patients. (F) MM patient CD138<sup>-</sup> BM cells were stimulated with anti-CD3/CD28/CD2 microbeads for 6 hours. Activation (CD69), intracellular TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  content and degranulation (CD107a) of TIGIT<sup>-</sup> and TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was determined by flow cytometry. Representative dot plots are shown as well as graphs displaying mean  $\pm$  SEM from n = 31 patients with MM. (G) MM patient CD138<sup>-</sup> BM cells were stained with CTV and stimulated with anti-CD3/CD28/CD2 microbeads for 5 days. Representative histogram showing the proliferation of TIGIT<sup>-</sup> (dark red) and TIGIT<sup>+</sup> (light red) CD8<sup>+</sup> T cells and graph recapitulating the percentage of divided TIGIT<sup>-</sup> and TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from the same culture (n = 20 MM patients). (H) TIGIT<sup>-</sup> and TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were sorted by flow cytometry and stimulated with anti-CD3/CD28/CD2 microbeads for 6 hours. TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production as well as degranulation were determined by flow cytometry. Data shown are from n = 8 to 12 MM patients. (I) Representative dot plot of CD8<sup>+</sup> BM T cells from HLA-A\*02<sup>+</sup> patients with MM stained with HLA-A\*02-NYESO1-PE multimers (left) and histogram showing the TIGIT expression in NY-ESO1-specific CD8<sup>+</sup> T cells (right). (J) MM patient CD138<sup>-</sup> BM cells were stimulated with HLA-A\*02-NY-ESO1-specific peptide (1  $\mu$ g/mL) for 6 hours. Representative dot plots as well as pooled data from n = 6 HLA-A2<sup>+</sup> MM patients with positive NY-ESO response are shown. Statistical differences between multiple groups were determined by (A,D-E) 1-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey posttest analysis, (B) correlations were assessed using a Pearson rank correlation test, and (C) analyses between 2 groups were performed using a Mann-Whitney U test or (F-H,J) Wilcoxon matched-pairs signed rank test. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ , \*\*\*\* $P < .0001$ . T<sub>CM</sub>, central memory; T<sub>EM</sub>, effector memory; T<sub>EMRA</sub>, terminal effector memory; T<sub>N</sub>, naïve.



**Figure 2. TIGIT blockade improves MM patient CD8<sup>+</sup> T-cell effector functions and protects mice against MM.** (A-B) C57BL/6 WT and *Tigit*<sup>-/-</sup> mice were challenged IV with  $2 \times 10^6$  Vk12653 MM cells. M-protein levels were determined (A) by serum electrophoresis at week 6 post-MM cell injection; (B) survival was monitored overtime. Data are pooled from 2 independent experiments with  $n = 17$  to 19 mice per group. (C) C57BL/6 WT and *Tigit*<sup>-/-</sup> mice were challenged IV with  $4 \times 10^5$  Vk12598 MM cells and monitored for survival. Data shown are from 1 experiment representative of 2, with  $n = 10$  to 12 mice per group. (D-F) C57BL/6 WT and *Tigit*<sup>-/-</sup> mice were challenged IV with  $1.6 \times 10^6$  Vk12653 cells on day 0 and treated with anti-CD8 $\beta$  mAbs or clg (100  $\mu$ g, IP) on days -1, 0, 7, 14, 21, and 28. At week 4 after MM inoculation, M-protein levels were determined by serum electrophoresis and myeloma burden in (E) spleen and (F) BM was determined by flow cytometry by gating on B220<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> MM cells. Data are from 1 experiment with  $n = 10$  mice per group. (G,H) C57BL/6 WT mice were challenged with  $1.5 \times 10^6$  (triangles) or  $2.0 \times 10^6$  (circles) Vk12653 MM cells, treated with anti-TIGIT mAbs or clg (200  $\mu$ g, IP) twice per week for 4 weeks. Graphs showing the (G) serum  $\gamma$ -globulin levels and (H) number of BM MM cells. Data are presented from 3 independent experiments with  $n = 29$  per group. (I-J) C57BL/6 WT mice were challenged with  $4 \times 10^5$  Vk12598 MM cells, treated with anti-TIGIT mAbs, anti-PD-1 mAbs, or clg (200  $\mu$ g, IP) twice per week for 4 weeks and monitored for survival. (I) Data are pooled from 3 independent experiments with  $n = 19$  to 30 mice per group. (J) Mice were treated with anti-CD8 $\beta$  mAbs or clg (100  $\mu$ g) days -1, 0, 7, 14, 21, and 28 ( $n = 11$  to 12 per group). (K) C57BL/KaLwRijHsd mice ( $n = 5$  per group) were challenged with  $2 \times 10^6$  5TGM1 MM cells, treated with anti-TIGIT mAbs or clg (200  $\mu$ g, IP) twice per week for 4 weeks and monitored for survival. (L) MM patient CD138<sup>-</sup> BM cells were stimulated by anti-CD3/CD28/CD2 microbeads for 6 hours in the presence of anti-TIGIT mAbs (10  $\mu$ g/mL) or clg. Graphs showing the frequencies of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and CD107a-positive CD8<sup>+</sup> T cells ( $n = 16$  MM patients). (M) Graphs showing the concentrations of the indicated cytokines in the supernatants of purified MM patient BM CD8<sup>+</sup> T cells stimulated by anti-CD3/CD28/CD2 microbeads for 24 hours in the presence of anti-TIGIT mAbs (10  $\mu$ g/mL) or clg ( $n = 11$  patients with MM). (A,D-H) Data are presented as mean  $\pm$  SEM, with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple group were determined by 1-way ANOVA (D-F) with Tukey posttest analysis; differences between 2 groups were assessed using a (A) Mann-Whitney U, 2-way ANOVA (G-H), or (L-M) Wilcoxon matched-pairs signed rank test; (B-C,I-K) Differences in survival were determined by log-rank sum test. \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$ ; \*\*\*\* $P < .0001$ . clg, control immunoglobulin; IP, intraperitoneal.

NY-ESO-1 MM antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 1I), and TIGIT expression was again associated with reduced TNF $\alpha$  production of CD8<sup>+</sup> T cells upon stimulation with NY-ESO-1 peptide (Figure 1J). Although these results demonstrate that a significant fraction of TIGIT<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells within the BM of patients with MM have antimyeloma reactivity, we cannot firmly exclude that TIGIT upregulation on CD8<sup>+</sup> T cells might be a more general phenomenon and the consequence of chronic exposure to inflammatory mediators frequently associated with myeloma development.<sup>17,18</sup> Still, these results establish that in MM, TIGIT expression defines a subset of exhausted CD8<sup>+</sup> T cells with severely impaired effector function.

To investigate TIGIT's role in MM pathogenesis in vivo, WT and *Tigit*<sup>-/-</sup> mice were challenged with Vk12653 MM cells. After 6 weeks, M-protein levels were significantly higher in the sera of WT mice (Figure 2A); this was associated with improved survival of *Tigit*<sup>-/-</sup> mice (Figure 2B). The advantage conferred by host TIGIT deficiency against MM was confirmed with another MM cell line, Vk12598 (Figure 2C). Interestingly, depletion of CD8<sup>+</sup> T cells strongly increased MM burden in *Tigit*<sup>-/-</sup> mice (Figure 2D-F), demonstrating that CD8<sup>+</sup> T cells play a crucial role in the protection of *Tigit*<sup>-/-</sup> mice against MM. Finally, we analyzed the therapeutic potential of blocking TIGIT function. Treatment with an anti-TIGIT mAbs significantly reduced tumor burden in an aggressive Vk12653 MM model (Figure 2G-H) and prolonged the survival of VK12598 MM-bearing mice in a CD8<sup>+</sup> T cell-dependent manner (Figure 2I-J). This effect was significant compared with anti-PD-1 mAb therapy (Figure 2I) and comparable to what we had previously reported when targeting CD137 in the same MM model.<sup>13</sup> Anti-TIGIT mAbs treatment was also efficient in the preclinical 5TGM1 MM model (Figure 2K) and in the context of stem cell transplantation.<sup>19</sup> Moreover, mAbs blocking TIGIT function significantly improved cytokine production and degranulation of MM patient CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 2L-M).

In conclusion, this study highlights a predominant inhibitory role of TIGIT in anti-MM CD8<sup>+</sup> T-cell responses. Our data demonstrate for the first time that blocking the TIGIT pathway prolongs survival in preclinical MM models and improves MM patients' CD8<sup>+</sup> T-cell functions, thereby providing a strong rationale for the evaluation of anti-TIGIT mAbs to treat MM.

## Acknowledgments

The authors thank Liam Town and Kate Elder for breeding, genotyping, maintenance, and care of the mice used in this study; the animal house and flow cytometry facilities at QIMR Berghofer Medical Research Institute and Cancer Research Center of Toulouse; members of Immunology in Cancer and Infection Laboratory and Cancer Immunoregulation

and Immunotherapy Laboratory for helpful suggestions and discussion; and Nathalie Rufer for providing phycoerythrin-labeled NY-ESO-1 multimers.

This study was supported by grants from the University of Queensland (UQ) International Postgraduate Research Scholarship (H.H.); UQ Australian Postgraduate Award and QIMR Berghofer Top-Up awards (H.H. and S.A.M.); National Health and Medical Research Council of Australia Early Career Fellowship (grant 1107417) and a PdCCRS grant from Cure Cancer Australia and Can Too (grant 1122183) (C.G.); Naito Foundation and QIMR Berghofer Seed Grant (K.N.); French National Cancer Institute (grant R16100BB) and Institut Universitaire du Cancer de Toulouse–Oncopole translational research program (L.M.); Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant PGA1\*20160203788) (Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse team 13), NH&MRC Program Grant (grant 1132519), Project Grant (grant 1098960), and a Senior Principal Research Fellowship (grant 1078671) (M.J.S.); and NH&MRC Program Grant (grant 1071822) and Research Fellowship (grant 1107797) (G.R.H.).

## Authorship

Contribution: Study conception and design undertaken by C.G., K.N., L.M., and M.J.S. Data acquired by C.G., H.H., N.C., K.N., Y.Y., M.W., M.C., S.K., T.T., K.M., S.K., K.S., and L.M. Data analyzed and interpreted by C.G., H.H., N.C., K.N., S.K., T.T., L.M., and M.J.S. Manuscript was drafted by C.G. and H.H. Critical revision and editing undertaken by S.K., K.N., S.A.M., G.R.H., W.C.D., H.A.-L., M.W.L.T., L.M., and M.J.S. Supervision done by M.J.S., L.M., G.R.H., and M.W.L.T.

Conflict-of-interest disclosure: M.J.S. has research agreements with Bristol Myers Squibb, Tizona Therapeutics, and Aduro Biotech. W.C.D. has received a speaker's honorarium from AMGEN. The remaining authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: C.G., 0000-0002-7917-2432; K.N., 0000-0002-6631-9028; L.M., 0000-0002-0867-7724; M.J.S., 0000-0001-7098-7240.

Correspondence: Camille Guillerey, QIMR Berghofer Medical Research Institute, 300 Herston Rd, Herston, QLD 4006, Australia; e-mail: camille.guillerey@qimrberghofer.edu.au; and Mark J. Smyth, QIMR Berghofer Medical Research Institute, 300 Herston Rd, Herston, QLD 4006, Australia; e-mail: mark.smyth@qimrberghofer.edu.au.

## Footnotes

Submitted 4 January 2018; accepted 27 June 2018. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 9 July 2018; DOI 10.1182/blood-2018-01-825265.

\*C.G., H.H., L.M., and M.J.S. contributed equally to this work.

There is a *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

## REFERENCES

- Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3:17046.
- D'Agostino M, Boccadoro M, Smith EL. Novel immunotherapies for multiple myeloma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12(4): 344-357.
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-264.
- Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MW. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(3):143-158.
- Rosenblatt J, Avigan D. Targeting the PD-1/PD-L1 axis in multiple myeloma: a dream or a reality? *Blood*. 2017;129(3): 275-279.
- Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(4):243-254.
- Zhu Y, Panizza A, Schulick AC, et al. Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J Exp Med*. 2016; 213(2):167-176.
- Blake SJ, Dougall WC, Miles JJ, Teng MW, Smyth MJ. Molecular pathways: targeting CD96 and TIGIT for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2016;22(21): 5183-5188.
- Manieri NA, Chiang EY, Grogan JL. TIGIT: a key inhibitor of the cancer immunity cycle. *Trends Immunol*. 2017;38(1): 20-28.
- Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, et al. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol*. 2014;15(5): 431-438.

11. Chesi M, Matthews GM, Garbitt VM, et al. Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood*. 2012; 120(2):376-385.
12. Lawson MA, McDonald MM, Kovacic N, et al. Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat Commun*. 2015;6(1):8983.
13. Guillerey C, Ferrari de Andrade L, Vuckovic S, et al. Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent [published correction in *J Clin Invest*. 2015; 125(7):2094]. *J Clin Invest*. 2015;125(5): 2077-2089.
14. Schmid DA, Irving MB, Posevitz V, et al. Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function. *J Immunol*. 2010;184(9):4936-4946.
15. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res*. 2007;67(18): 8444-8449.
16. Kong Y, Zhu L, Schell TD, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) associates with CD8+ T-cell exhaustion and poor clinical outcome in AML patients. *Clin Cancer Res*. 2016;22(12):3057-3066.
17. Nakamura K, Kassem S, Cleyne A, et al. Dysregulated IL-18 is a key driver of immunosuppression and a possible target in the multiple myeloma microenvironment. *Cancer Cell*. 2018;33(4):634-648.e5.
18. Kawano Y, Zavidij O, Park J, et al. Blocking IFNAR1 inhibits multiple myeloma-driven Treg expansion and immunosuppression. *J Clin Invest*. 2018;128(6):2487-2499.
19. Minnie SA, Kuns RD, Gartlan KH, et al. Myeloma escape after stem cell transplantation is a consequence of T-cell exhaustion and is prevented by TIGIT blockade. *Blood*. 2018;132(16): 1675-1688.



**blood**<sup>®</sup>

2018 132: 1689-1694

doi:10.1182/blood-2018-01-825265 originally published  
online July 9, 2018

## **TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8<sup>+</sup> T-cell immunity against multiple myeloma**

Camille Guillerey, Heidi Harjunpää, Nadège Carrié, Sahar Kassem, Tricia Teo, Kim Miles, Sophie Krumeich, Marianne Weulersse, Marine Cuisinier, Kimberley Stannard, Yuan Yu, Simone A. Minnie, Geoffrey R. Hill, William C. Dougall, Hervé Avet-Loiseau, Michele W. L. Teng, Kyohei Nakamura, Ludovic Martinet and Mark J. Smyth

---

Updated information and services can be found at:

<http://www.bloodjournal.org/content/132/16/1689.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Brief Reports](#) (2023 articles)

[Immunobiology and Immunotherapy](#) (5698 articles)

[Lymphoid Neoplasia](#) (3100 articles)

[Multiple Myeloma](#) (444 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

[http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub\\_requests](http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>

## Résumé en anglais

CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTL) are key immune cells that play an important role in the control of tumor development through their ability of killing cancer cells. However, cancer cells can frequently escape CD8 T-cell recognition and cytolytic functions through the engagement of inhibitory receptors such as CTLA-4 and PD-1. Although immune checkpoint blockade (ICB) such as monoclonal antibody (mAb) anti-PD-1 has represented a promising cancer therapy in cancer care, clinical responses are not observed in the majority of cancer patients. Therefore, elucidating the mechanisms of this lack of responsiveness and finding additional signals that regulate CD8<sup>+</sup> T cell anti-tumor functions has become a major priority. While most of the experimental strategy mainly focus on the identification of additional inhibitory receptors, the importance of coactivating receptors in the antitumor CD8<sup>+</sup> T cell functions and ICB efficacy remains to be better investigated. Initially described as an adhesion molecule, CD226 (DNAM-1) is co-activating receptor expressed by NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells that stimulate the secretion of pro-inflammatory cytokines and release of cytolytic granules towards target cells. Its ligands, the nectin and nectin-like receptors CD112 and CD155, are often expressed on cancer cells and CD226 was shown to play a critical role in immunosurveillance in numerous tumor mouse models. The inhibitory receptors TIGIT and CD96 that compete with CD226 were recently identified as promising immunotherapeutic targets to restore CD8<sup>+</sup> T cell reactivity against cancer, thus highlighting the importance of CD226 axis in the regulation of anti-tumor immune responses.

During my PhD, I found that CD226 identifies CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells populations in healthy donors and in cancers patients. Through transcriptomic, molecular and functional analysis, I found that the CD226 absence alters CD8<sup>+</sup> T cell responsiveness to TCR stimulation. Unlike CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells have deeply intrinsic functional abnormalities such as poor proliferation, cytokines production and cytotoxic functions upon TCR stimulation. Using complementary set of experiments involving human samples and mouse tumors models, I observed that tumor development favors the accumulation of tumor-infiltrating CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TILs) through an Eomes-dependent mechanism. In cancer patients and in preclinical models, the similar exhausted phenotype between CD226<sup>-</sup> and CD226<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs suggest that the absence of CD226 identifies highly dysfunctional CD8<sup>+</sup> T cells. Importantly, I observed that anti-PD-1 immunotherapy failed to restore effector functions of CD226<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. Therefore, my results strongly suggest that in addition of expressing inhibitory immune checkpoints, cancer could evade CTL-based mechanisms through the downregulation of CD226. The loss of CD226 could represent a novel mechanism of tumor resistance to ICB and partially explain the functional failures of CD8<sup>+</sup> T cells responsible for poor clinical responses in a fraction of cancer patients. Therefore, CD226 could be a predictive marker for the clinical outcomes of ICB-treated cancer patients.



## Résumé en français

Les lymphocytes cytotoxiques T CD8<sup>+</sup> (LT CD8<sup>+</sup>) sont des cellules de l'immunité adaptative qui jouent un rôle majeur dans les réponses immunitaires antitumorales puisqu'ils reconnaissent et tuent spécifiquement les cellules cancéreuses. Cependant, leurs fonctions antitumorales sont souvent limitées par l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que CTLA-4 et PD-1. Bien que les immunothérapies basées sur le blocage de ces récepteurs représentent l'une des avancées majeures dans le traitement du cancer, de nombreux cancers y sont réfractaires. Ainsi, il est aujourd'hui nécessaire de comprendre davantage les mécanismes à l'origine de cette résistance thérapeutique et d'identifier d'autres cibles régulant les fonctions antitumorales des LT CD8<sup>+</sup>. Tandis que les stratégies immunothérapeutiques actuelles se concentrent essentiellement sur l'identification d'autres récepteurs inhibiteurs, le rôle des récepteurs activateurs des LT CD8<sup>+</sup> dans la réponse aux immunothérapies reste encore peu approfondi. Initialement décrite comme une molécule d'adhésion, CD226 (DNAM-1) est un récepteur coactivateur exprimé par les cellules NK et les LT CD8<sup>+</sup> qui stimule leur production de cytokines inflammatoires et de granules cytolytiques vis-à-vis de cellules cibles suite à son interaction avec ses ligands CD112 et CD155. La nectine CD112 et la "nectine-like" CD155 sont fréquemment exprimées par les cellules tumorales et des modèles murins immunodéficients CD226<sup>-/-</sup> ont pu démontrer que CD226 joue rôle critique dans l'immunosurveillance antitumorale. Par ailleurs, les récepteurs inhibiteurs TIGIT et CD96 qui rentrent en compétition avec CD226 ont récemment été caractérisés comme des cibles d'immunothérapies intéressantes, ce qui renforce l'idée selon laquelle la réponse immunitaire antitumorale est régulée par CD226.

Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence que CD226 identifie les populations LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> et LT CD226<sup>+</sup> chez des individus sains et des patients atteints de cancer. Des analyses transcriptomiques et fonctionnelles m'ont permis de démontrer que l'absence de CD226 conduit à une altération majeure de la prolifération et des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> stimulés par le TCR. Mes analyses effectuées sur des LT CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur chez des patients atteints de cancer et chez des souris porteuses de tumeur m'ont conduit à observer que le développement tumoral favorise l'accumulation des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> hyporépondeurs au TCR au site de la tumeur. Des modèles murins précliniques ont pu ensuite mettre en évidence que cette accumulation progressive des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> dépend du facteur de transcription Eomes. Le phénotype « épuisé » est identique entre les LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> et LT CD226<sup>-</sup> infiltrant la tumeur et seule l'absence de CD226 est à l'origine de la diminution des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>.

De façon importante, j'ai pu observer que l'immunothérapie anti-PD-1 ne parvient pas à restaurer les fonctions des LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup>, contrairement aux LT CD8<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup>.

Ainsi, mes résultats indiquent qu'au-delà d'exprimer des récepteurs inhibiteurs, la perte du récepteur coactivateur CD226 est un nouveau mécanisme pouvant contribuer à l'épuisement lymphocytaire et à l'échappement de la tumeur aux LT CD8<sup>+</sup>. CD226 serait donc un marqueur de bon pronostic pour les patients traités avec les immunothérapies anti-PD-1, et inversement l'absence de CD226 pourrait expliquer en partie les faibles réponses cliniques de certains patients.