



HAL
open science

Rôle de la Neuropiline-1 dans les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 antitumoraux

Marine Leclerc

► **To cite this version:**

Marine Leclerc. Rôle de la Neuropiline-1 dans les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 antitumoraux. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS458 . tel-03092300

HAL Id: tel-03092300

<https://theses.hal.science/tel-03092300v1>

Submitted on 2 Jan 2021

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

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

Rôle de la Neupiline-1 dans les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 antitumoraux

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°582
Cancérologie : Biologie – Médecine – Santé
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à l'Institut Gustave Roussy, le 03 Décembre 2018, par

Marine Leclerc

Composition du Jury :

Eric Deutsch Professeur, Gustave Roussy (INSERM-U1030)	Président
Christophe Caux Directeur de Recherche, CRCL (INSERM-U1052/CNRS-5286)	Rapporteur
Bruno Segui Professeur des Universités, Université Paul Sabatier	Rapporteur
Magali Terme Maître de conférence, Université Paris Descartes	Examinatrice
Fathia Mami-Chouaib Directrice de Recherche, Gustave Roussy (INSERM-U1186)	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Les remerciements, ce moment étrange où l'on a beaucoup de choses à dire mais où aucun mot ne sort. Écrire ces quelques lignes me permet de vous remercier sincèrement pour tout ce que vous avez fait pour moi, et c'est notamment grâce à vous qui avez su être à mes côtés pendant ces années que j'en suis enfin arrivée là !

En premier lieu, je tiens à remercier le Dr Fathia Mami-Chouaib pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire lors de mon stage de master 2 et mes 4 années de thèse. Je vous remercie de m'avoir proposé et permis d'initier ce sujet de thèse si passionnant. J'ai appris énormément tant au niveau scientifique que personnel. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir laissé cette liberté qui m'a permis de grandir scientifiquement. Merci aussi pour votre temps et votre disponibilité malgré vos nombreuses charges, ainsi que de votre aide et vos conseils apportés lors de la rédaction de ce manuscrit et de l'article qui découle de ces 4 années de travail. Merci aussi pour votre compréhension et vos encouragements lors de ces dernières semaines de thèse intenses.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres de mon jury, le Professeur Éric Deutsch pour avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse ; le Professeur Bruno Segui pour ses suggestions et pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit; le Dr Christophe Caux pour avoir accepté de relire et d'évaluer ce travail ; le Dr Magali Terme pour avoir accepté d'examiner ce travail ; et le Dr Georges Bismuth pour avoir accepté d'examiner ce travail mais également pour nos nombreux échanges scientifiques.

Je tiens aussi à remercier le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur ainsi que la Ligue Nationale Contre le Cancer pour avoir financé respectivement mes 3 premières et ma 4ème année de thèse.

Je tiens à remercier de tout mon coeur Christine Leroy pour sa disponibilité, sa gentillesse et pour tout ce que tu fais pour l'unité !

Un grand (voire énorme !) merci aux filles (connues aussi sous le nom de morues ;)), Stéphanie, Ines, Ludiane, Gwen et la petite dernière Elodie, pour tout ce que vous avez fait pour moi pendant ces années. Vous avez réussi à me supporter, enfin plutôt mes blagues pas très drôles ☺, à être là dans les bons et mauvais moments, et pour nos discussions scientifiques (ou pas !) lors de nos

nombreuses pauses chocolat (qui sont absolument nécessaires pour le bon déroulement de la thèse !). Je n'arrive pas à écrire tout ce que je voudrais, mais sachez que vous êtes des filles en or et que ces années de thèses resteront un très bon souvenir grâce à vous !

Merci aussi à Aurélie pour nos discussions matinales mais aussi pour tes talents culinaires, et ta connaissance de tous les recoins du labo qui nous a sauvés plus d'une fois !.

Stéphane, qui est pratiquement un membre de la team FMC ;), merci pour tes nombreux conseils scientifiques et tes discussions sur de nombreux sujets qui nous a maintenus en haleine pendant de nombreux repas, et cela pratiquement toujours dans la bonne humeur !

Merci à tous ceux qui ont contribué à la bonne ambiance du labo et qui étaient toujours là pour me donner de bons conseils ou tout simplement pour discuter : Jérôme, Stéphanie B., Abdou, Alice, Florine, Flore, Sophie G., Pauline, les petites nouvelles Marie et Isabelle (bon courage pour la thèse vous verrez c'est une aventure hors du commun !), les anciens membres Zaeem, Meriem, Yosra, Thouraya, Linda et Catherine, ainsi que tous les autres membres de l'unité U1186 ! J'en profite aussi pour remercier spécialement et sincèrement Mehdi, merci pour tout ce que tu as fait pour moi ces derniers mois 😊

Je remercie aussi la plateforme d'évaluation préclinique et la plateforme d'imagerie et de cytométrie de Gustave Roussy. Je souhaite remercier plus particulièrement Yann Lecluse qui m'a formé à l'utilisation du FACS.

Un immense merci à la « Dream Team », Valentine, Solal, Jeff, Gaby, Camille et Chloé, pour votre soutien inconditionnel, vos nombreux conseils, nos fous rires et bien sûr nos nombreux voyages qui ont égayé ma thèse (d'ailleurs vivement le prochain pour célébrer la fin de celle-ci ;)). Pour la plupart nous avons traversé l'aventure de la thèse ensemble, et nos chemins vont bientôt se séparer mais je sais que malgré la distance nous resterons toujours amis et ce sera l'occasion de se prévoir de nouveaux voyages ensemble !

Pour finir un grand merci à ma famille, plus spécialement à mes parents, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Vous avez toujours été là pour moi, pour m'encourager, me soutenir, m'accompagner, m'aider et me consoler. Vous avez toujours cru en moi et votre amour m'a permis d'être qui et où je suis aujourd'hui. Je voudrais aussi remercier spécialement mon double qui m'a soutenu pendant toutes les étapes de la thèse (même à l'autre bout du monde), et je te souhaite bon courage pour tes derniers mois de thèse, tu vas voir cela vaut vraiment le coup !

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
LISTE ABRÉVIATIONS	7
LISTE FIGURES.....	10
LISTE TABLEAUX.....	11
INTRODUCTION	12
I. La réponse immunitaire antitumorale	12
1. Du concept de l'immunosurveillance à celui de l'immunoediting.....	12
2. Les lymphocytes T CD8 ⁺ : acteurs principaux de la réponse antitumorale.....	13
2.1. Antigènes de haute spécificité tumorale.....	14
2.1.1. Les antigènes viraux	14
2.1.2. Les antigènes mutés	14
2.1.3. Les antigènes produits par des changements épigénétiques	14
2.2. Antigènes de faible spécificité tumorale	15
2.2.1. Les antigènes de tissus différenciés non modifiés	15
2.2.2. Les antigènes sur-exprimés	15
3. Mécanismes d'échappement de la tumeur au système immunitaire	16
3.1. Mécanismes intrinsèques à la cellule tumorale	16
3.1.1. Reconnaissance immunitaire altérée	16
3.1.2. Résistance ou une survie accrue des cellules tumorales.....	16
3.2. Microenvironnement tumoral.....	17
3.2.1. Les lymphocytes T CD4 ⁺ régulateurs	17
3.2.2. Les cellules myéloïdes suppressives	19
3.2.3. Les macrophages associés aux tumeurs.....	19
3.3. Mécanismes inhérents aux Lymphocytes T CD8 ⁺	20
3.3.1. Déficit de recrutement à la tumeur.....	20
3.3.2. Inhibition de la fonction cytotoxique	20
II. Du combat à l'épuisement des lymphocytes T CD8 ⁺	22
1. Développement et acquisition des fonctions effectrices	22
2. Reconnaissance et destruction de la cible.....	23
3. Épuisement des lymphocytes T CD8 ⁺	24
3.1. Définition.....	24
3.2. Facteurs induisant l'épuisement des lymphocytes T CD8 ⁺	25
3.2.1. Exposition persistante à l'antigène	25
3.2.2. Les récepteurs inhibiteurs	26
3.2.3. Les médiateurs solubles	27
3.2.4. Les cellules immunitaires	28

3.3.	Caractéristiques moléculaires et phénotypiques.....	30
III.	Restaurer les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 ⁺ épuisés	33
1.	Les récepteurs inhibiteurs.....	33
1.1.	PD-1 (programmed cell death 1)	34
1.2.	CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4).....	36
1.3.	TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains).....	36
1.4.	LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3)	37
1.5.	TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-containing protein 3)	37
1.6.	2B4.....	37
1.7.	BTLA (B and T lymphocyte attenuator)	38
1.8.	Identification de nouveaux récepteurs	38
2.	Les récepteurs co-stimulateurs.....	38
2.1.	GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor)	39
2.2.	OX40	40
2.3.	4-1BB	40
2.4.	ICOS (Inducible T cell costimulator)	40
3.	Immunothérapies anticancéreuses	41
3.1.	Immunothérapie : anticorps monoclonaux agonistes et antagonistes.....	42
3.2.	Combinaisons	45
3.2.1.	Combinaison entre les anticorps.....	45
3.2.2.	Combinaison avec la chimiothérapie	46
3.2.3.	Combinaison avec la radiothérapie.....	47
3.2.4.	Combinaison avec les traitements ciblant le microenvironnement tumoral.....	47
3.3.	Résistances	48
IV.	Le récepteur neuronal « la Neuropiline-1 » participe-t-il à l'inhibition des fonctions des lymphocytes T CD8 ⁺ antitumoraux ?.....	50
1.	Structure de la Nrp-1	50
2.	La Nrp-1 interagit avec un large répertoire de ligands	52
2.1.	Les sémaphorines de classe 3.....	52
2.2.	Les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire	54
2.3.	Autres ligands	56
2.3.1.	Nrp-1 et EGF/EGFR	56
2.3.2.	Nrp-1 et TGF-β/ TGF-βR.....	56
2.3.3.	Nrp-1 et HGF/c-Met.....	57
2.3.4.	Nrp-1 et PDGF/PDGFR	57
2.3.5.	Nrp-1 et les intégrines	57
2.3.6.	Nrp-1 et B7-H4.....	58
3.	Rôles physiologiques et pathologiques.....	58

3.1.	Rôle de la Nrp-1 dans le système nerveux central et vasculaire.....	58
3.2.	Rôle de la Nrp-1 dans le système immunitaire	60
3.2.1.	Les macrophages	62
3.2.2.	Les cellules dendritiques	62
3.2.3.	Les lymphocytes	63
3.3.	Implication de la Nrp-1 dans le cancer	66
4.	La Nrp-1 comme cible thérapeutique	69
4.1.	Les Acm anti-Nrp-1	69
4.2.	Cibler les ligands de la Nrp-1	69
4.3.	Utilisation de la forme soluble de la Nrp-1	69
	OBJECTIFS	70
	RÉSULTATS.....	72
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	114
I.	Expression et régulation de la Nrp-1 et des iRs.....	114
II.	L'expression de la Nrp-1 est associée à un état dysfonctionnel des LT CD8 ⁺	115
III.	La Nrp-1 joue un rôle dans la régulation des fonctions effectrices des LT CD8 ⁺	117
IV.	Cibler la Nrp-1 et combinaison d'immunothérapies	118
V.	Importance des molécules neuronales dans le système immunitaire.....	120
	CONCLUSION	122
	BIBLIOGRAPHIE.....	125
	ANNEXE	146

LISTE ABRÉVIATIONS

A

aa	<i>Acide aminé</i>
Acm	<i>Anticorps monoclonal</i>
ADORA2A	<i>Récepteur d'adénosine A2A</i>
ADP	<i>Adénosine diphosphate</i>
AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
AITL	<i>Lymphome angio-immunoblastique à cellules T</i>
AMM	<i>Autorisation de mise sur le marché</i>
AMP	<i>Adénosine monophosphate</i>
aR	<i>Récepteur co-stimulateur / activateur</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ATP	<i>Adénosine triphosphate</i>

B

B2M	<i>Bêta-2-microglobuline</i>
BATF	<i>Basic leucine zipper transcription factor ATF-like</i>
BLIMP-1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>

C

CBNPC	<i>Cancers bronchique non à petites cellules</i>
CCL	<i>Chemokine ligand</i>
CCR	<i>Chemokine Receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK2	<i>Cyclin-Dependant Kinase 2</i>
CEACAM1	<i>Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 1</i>
Chrom	<i>Chromosome</i>
CMH	<i>Complexe majeur d'histocompatibilité</i>
CMLV	<i>Cellules musculaires lisses vasculaires</i>
CPA	<i>Cellule présentatrice d'antigène</i>
CTL	<i>Lymphocyte T cytotoxique</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4</i>
CXCL	<i>CXC-chemokine ligand</i>
CXCR	<i>CXC-chemokine receptor</i>

D

DC	<i>Cellule dendritique</i>
----	----------------------------

E

EAE	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EBV	<i>Virus d'Epstein-Barr</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	<i>Transition épithélio-mésenchymateuse</i>
EOMES	<i>Eomesodermin</i>

F

Foxo1	<i>Forkhead box protein O1</i>
FoxP1	<i>Forkhead box protein P1</i>
FoxP3	<i>Forkhead box protein P3</i>

G

Gal-9	<i>Galectine-9</i>
GC	<i>Granule cytotoxique</i>

GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
GMP	<i>Guanosine monophosphate</i>
GPI	<i>Glycosyl-phosphatidyl-inositol</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GVHD	<i>Graft-versus-host disease</i>
Gzm	<i>Granzyme</i>
H	
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Protein 1</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
HTLV-1	<i>Human T-lymphotropic virus 1</i>
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i>
I	
ICOS	<i>Inducible T cell costimulator</i>
IDO	<i>indoleamine 2,3 dioxygénase</i>
IFN	<i>Interféron</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
IL	<i>Interleukine</i>
iR	<i>Récepteur inhibiteur</i>
IRF4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif</i>
ITSM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
K	
kDa	<i>Kilodalton</i>
L	
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LB	<i>Lymphocyte B</i>
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LFA-1	<i>Leukocyte function-associated antigen 1</i>
LT	<i>Lymphocyte T</i>
M	
MAM	<i>mepirin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu</i>
MART1	<i>Melanoma antigen recognized by T cells 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MDA	<i>Melanocyte differentiation antigens</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MPEC	<i>Memory precursor effector cells</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
N	
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T</i>
Nrp	<i>Neuropiline</i>
P	
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
pDC	<i>DC plasmacytoïde</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i>
PFN	<i>Perforine</i>

PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
PKC	<i>Protéine kinase C</i>
PLC γ	<i>Phospholipase C gamma</i>
PLXN	<i>Plexine</i>
PMEL	<i>Premelanosome protein</i>
PP2A	<i>Protéine phosphatase 2</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVR	<i>Récepteur du poliovirus</i>
R	
RAG	<i>Recombination-activating genes</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
S	
SAP	<i>Signaling lymphocyte activated molecule-associated protein</i>
Sema	<i>Sémaphorine</i>
SHP	<i>Src Homology region 2 domain-containing Phosphatases</i>
SI	<i>Synapse immunologique</i>
SLEC	<i>Short-Lived Effector Cells</i>
SNC	<i>Système nerveux central</i>
SPRY2	<i>Sprouty homolog 2</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator</i>
T	
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TCF-1	<i>T-cell specific transcription factor 1</i>
T _{CM}	<i>LT mémoires centrales</i>
TCR	<i>Récepteur des cellules T</i>
TEC	<i>Cellules épithéliales thymiques</i>
T _{eff}	<i>LT effecteur</i>
T _{EM}	<i>LT effecteur/mémoire</i>
T _{fh}	<i>LT auxiliaires folliculaires</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TIL	<i>Lymphocyte infiltrant la tumeur</i>
Tim-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-containing protein 3</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TNFRSF	<i>Superfamille des TNFR</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
Treg	<i>Lymphocyte T régulateur</i>
T _{RM}	<i>LT mémoire résidents dans le tissu</i>
TRP	<i>Tyrosinase Related Protein</i>
V	
VEGF	<i>facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire</i>
VHL	<i>von Hippel-Lindau</i>
VIH	<i>virus de l'immunodéficience humaine</i>
Z	
ZAP70	<i>z-chain(TCR)-associated protein kinase 70kDa</i>

LISTE FIGURES

Figure 1 : Immuno-édition du cancer – Élimination, équilibre et échappement.....	13
Figure 2 : Mécanismes de suppression par les lymphocytes T régulateurs.....	18
Figure 3 : Phénotype et caractéristiques des différentes populations de lymphocytes T CD8 ⁺	23
Figure 4 : Mécanismes induisant l'épuisement des lymphocytes T CD8 ⁺	25
Figure 5 : Caractéristiques moléculaires et phénotypiques des lymphocytes T CD8 ⁺ dysfonctionnels	32
Figure 6 : Les récepteurs inhibiteurs.....	33
Figure 7 : Mécanismes d'inhibition des fonctions lymphocytaires par la signalisation PD-1/PD-L1	35
Figure 8 : Les récepteurs co-stimulateurs.....	39
Figure 9 : Cibles des immunothérapies utilisant des anticorps	42
Figure 10 : Structure des Neuropilines.....	51
Figure 11 : Structure des différentes classes de sémaphorines.....	53
Figure 12 : Les Neuropilines et les sémaphorines de classe 3	54
Figure 13 : Les Neuropilines et VEGF	56
Figure 14 : Les différentes fonctions de la Neuropiline-1 dans le cancer	67
Figure 15 : Rôle de la Neuropiline-1 dans l'immunité antitumorale.....	68
Figure 16 : Modèles expérimentaux	71
Figure 17 : Les différents états d'épuisement des lymphocytes T CD8 ⁺	115
Figure 18 : Schéma récapitulatif de l'expression et du rôle de la Nrp-1 sur les lymphocytes T CD8 ⁺ antitumoraux.....	124

LISTE TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des anticorps ciblant des récepteurs inhibiteurs et co-stimulateurs actuellement en développement clinique et préclinique	44
Tableau 2 : Phénotype des souris génétiquement modifiées pour la Neuropiline-1	59
Tableau 3 : Expression et rôle de la Neuropiline-1 dans les cellules immunitaires.....	61

INTRODUCTION

I. La réponse immunitaire antitumorale

1. Du concept de l'immunosurveillance à celui de l'immunoediting

La contribution du système immunitaire au contrôle de la croissance et de la propagation du cancer est débattue depuis de nombreuses années. L'hypothèse de l'immunosurveillance du cancer, initialement postulée par Ehrlich puis approfondie par Burnet et Thomas à la fin des années 1950, proposait qu'à mesure que les tumeurs se développaient, elles pouvaient déclencher une immunité efficace qui contrôlait la croissance tumorale (Burnet 1957; Dunn, Bruce et al. 2002). En effet, des expériences pour prouver cette hypothèse ont démontré que des souris dont le système immunitaire était affaibli étaient plus sensibles au développement de tumeurs que les souris immunocompétentes (Foley 1953). Cependant, la controverse sur ce concept a persisté étant donné que la plupart de ces résultats se limitaient à des tumeurs induites chimiquement ou par des virus. Dans le cas des tumeurs associées à un virus, il a été débattu que les résultats observés pouvaient être attribués à une transformation virale consécutive à une immunité affaiblie contre le virus, plutôt qu'à un effet direct d'une réponse immunitaire affaiblie dirigée contre les cellules cancéreuses. Des travaux ultérieurs ont alimenté le débat car une série d'expériences comparant des souris sauvages (immunocompétentes) et des souris *nude* (immunodéficientes) n'a montré aucune différence dans l'incidence des tumeurs d'origine non virale (Rygaard and Povlsen 1974; Rygaard and Povlsen 1974). Ce n'est qu'au cours des deux dernières décennies que le concept d'immunosurveillance du cancer a été enfin accepté à la suite d'une série de travaux démontrant que des souris génétiquement déficientes dans un ensemble de composantes clés de la réponse immunitaire ($RAG^{-/-}$, $RAG^{-/-} STAT^{-/-}$, $PFN^{-/-}$, $IFN-\gamma^{-/-}$ et $IFN-\gamma R^{-/-}$) étaient plus vulnérables aux tumeurs spontanées, transplantables et chimiquement induites que les souris sauvages (Kaplan, Shankaran et al. 1998; Shankaran, Ikeda et al. 2001; Street, Cretny et al. 2001; Street, Trapani et al. 2002).

Par la suite, le concept d'immunosurveillance du cancer s'est transformé en un modèle plus vaste et plus complexe d'« immuno-édition du cancer ». Initialement introduit par Ikeda, Old et Schreiber (Dunn, Bruce et al. 2002; Ikeda, Old et al. 2002), il est défini par trois événements clés : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (**Figure 1**). La phase d'« élimination » correspond à l'immunosurveillance du cancer décrite précédemment, dans laquelle les tumeurs sont détectées et détruites par divers composants du système immunitaire. Pendant la phase d'« équilibre », une stabilité est établie entre la tumeur et le système immunitaire au cours de laquelle ces deux composantes cellulaires sont influencées réciproquement l'une par l'autre. Enfin, le système immunitaire contribue à la sélection

de variants tumoraux qui se développent de façon incontrôlable, aboutissant ainsi à l'« échappement » tumoral (Koebel, Vermi et al. 2007).

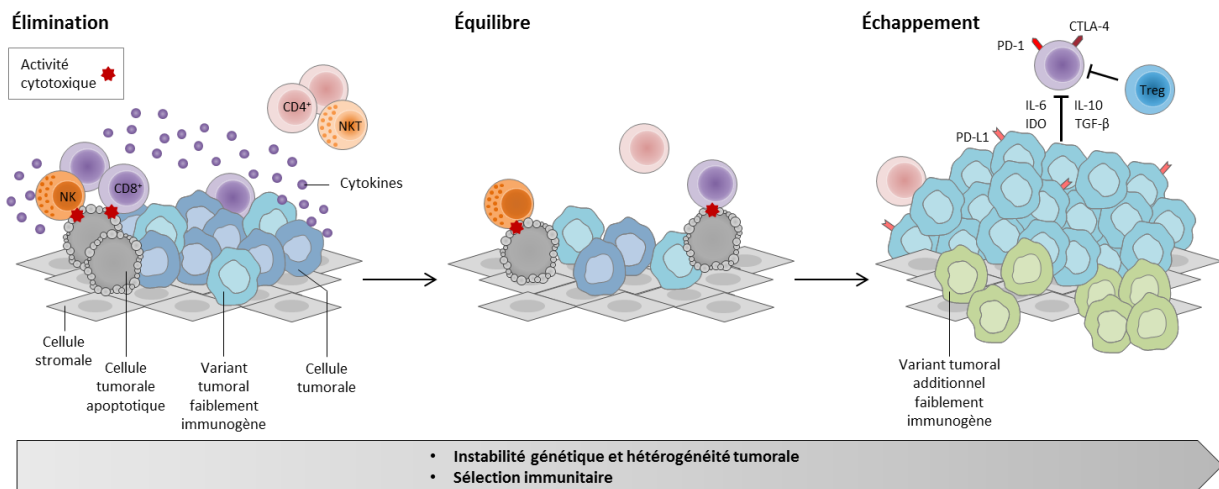


Figure 1 : Immuno-édition du cancer – Élimination, équilibre et échappement

La phase d'élimination correspond à la destruction des cellules tumorales fortement immunogènes par le système immunitaire, ayant pour but d'empêcher le développement d'une tumeur. Si toutes les cellules tumorales ne sont pas éliminées un état d'équilibre se crée entre la tumeur et les cellules du système immunitaire. Le système immunitaire contrôle la croissance de la tumeur sans pour autant l'éradiquer. Une pression de sélection est alors exercée par le système immunitaire qui conduit à l'émergence de variants tumoraux résistants. La phase d'échappement est alors amorcée, ainsi les cellules tumorales vont échapper au système immunitaire et proliférer de manière incontrôlée.

Ainsi, l'ensemble du système immunitaire contribue à l'immunosurveillance du cancer. Le développement d'une réponse immunitaire se traduit par l'activation de 2 composantes clés : une réponse innée, qui constitue la première ligne de défense mettant en jeu les cellules *Natural Killer* (NK), les cellules dendritiques (DC), les macrophages, et les cellules T *Natural Killer* (NKT), et une réponse adaptative impliquant une réponse humorale exercée par les lymphocytes B (LB) et une réponse à médiation cellulaire développée par les lymphocytes T (LT).

2. Les lymphocytes T CD8⁺ : acteurs principaux de la réponse antitumorale

Les lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8⁺) sont les principales cellules effectrices de l'immunité cellulaire adaptative et sont cruciales pour la réponse immunitaire antitumorale. Ainsi de nombreuses stratégies immunothérapeutiques visent à activer ces cellules pour favoriser la destruction des cellules tumorales et à induire une mémoire immunitaire, qui à long terme permettrait d'éviter une récurrence de la maladie primaire ou l'apparition de métastases.

Les LT CD8⁺ sont capables de reconnaître, à la surface des cellules tumorales, des peptides dérivés d'antigènes tumoraux associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et d'induire une réponse spécifique contre ces antigènes afin de provoquer la lyse de

ces cellules entraînant ainsi une régression tumorale (Benchetrit, Gazagne et al. 2003). Les antigènes tumoraux reconnus par les LT CD8⁺ peuvent être classés en différentes catégories, selon leur profil d'expression par les tumeurs et les tissus sains, et en fonction de leur origine (Restifo, Dudley et al. 2012).

2.1. Antigènes de haute spécificité tumorale

Trois types d'antigènes tumoraux ont le potentiel d'induire des réponses immunitaires strictement spécifiques de la tumeur : les antigènes viraux, les antigènes résultant d'une mutation ou d'un réarrangement d'un gène, et les antigènes codés par les gènes de la lignée germinale lors de modifications épigénétiques.

2.1.1. Les antigènes viraux

Une origine virale a été démontrée dans un sous-ensemble important de tumeurs humaines, comprenant le carcinome cervical, l'hépatocarcinome, le carcinome nasopharyngé et la leucémie à cellules T de l'adulte. Dans ces cancers, les cellules tumorales peuvent exprimer des produits viraux qui sont des cibles des LT CD8⁺ car ils ne sont pas exprimés par les tissus sains. Par exemple, les protéines codées par le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Long, Parsonage et al. 2010) et du papillomavirus (HPV) (van der Burg and Melief 2011) sont exprimées par les cellules tumorales du carcinome nasopharyngé et du cancer du col de l'utérus respectivement.

2.1.2. Les antigènes mutés

Les gènes mutés contribuent largement à l'immunogénicité des tumeurs humaines. Les mutations provoquées par l'instabilité génétique des tumeurs produisent de nouveaux peptides antigéniques en substituant un acide aminé (aa), en modifiant le cadre de lecture ou en prolongeant la séquence codante au-delà du codon stop normal. Chez les patients atteints de cancer, environ la moitié des antigènes tumoraux reconnus par les LT CD8⁺ sont codés par des gènes mutés. Ces antigènes, appelés « néo-antigènes » sont particulièrement intéressants dans le contrôle des tumeurs car les LT CD8⁺ spécifiques ne sont pas éliminés lors de la sélection thymique (Vigneron, Stroobant et al. 2013).

2.1.3. Les antigènes produits par des changements épigénétiques

Des changements épigénétiques peuvent déclencher l'expression d'une catégorie de protéines non mutées appelées antigènes de la lignée germinale (Hofmann, Caballero et al. 2008). Ces antigènes sont normalement exprimés par les cellules germinales dans les testicules et les ovaires fœtaux, mais sont également exprimés dans de nombreux types de tumeurs. Ces antigènes tels que MAGE-A/B/C (Chinnasamy, Wargo et al. 2011), NY-ESO-1 (Robbins, Morgan et al. 2011) sont des

cibles immunothérapeutiques attrayantes en raison de leur expression partagée par de nombreux cancers de types histologiques différents et leur absence d'expression dans les tissus normaux.

2.2. Antigènes de faible spécificité tumorale

Ce groupe comprend les antigènes de différenciation et les antigènes dérivés de protéines surexprimées dans les tumeurs.

2.2.1. Les antigènes de tissus différenciés non modifiés

La réponse spontanée de LT CD8⁺ dirigée contre des antigènes de différenciation a été particulièrement bien documentée chez les patients atteints de mélanome. Ainsi les cellules tumorales expriment des antigènes qui sont caractéristiques de leur tissu d'origine et peuvent être reconnus par des LT CD8⁺. Les antigènes de différenciation des mélanocytes MDA (*Melanocyte Differentiation Antigens*) tels que PMEL (gp100) (Bakker, Schreurs et al. 1995), MART1 (*Melanoma antigen recognized by T cells 1*) (Kawakami, Eliyahu et al. 1994), TRP1 et TRP2 (*Tyrosinase Related Protein*) (Wolfel, Van Pel et al. 1994), sont exprimés par la plupart des mélanomes, mais sont également exprimés par les mélanocytes normaux dans la couche basale de la peau, dans l'épithélium pigmentaire rétinien ainsi que dans l'oreille interne (Overwijk and Restifo 2000). Cependant, il n'est pas connu à ce jour pourquoi la tolérance est incomplète vis-à-vis de ces antigènes.

2.2.2. Les antigènes sur-exprimés

Cette classe d'antigènes est le produit de gènes généralement exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules normales, mais qui sont surexprimés dans les cellules tumorales. La surexpression des protéines dans les tumeurs peut induire une réponse T CD8 spécifique. Cela s'explique par le fait qu'un seuil d'expression de l'antigène est nécessaire pour la reconnaissance par les LT CD8⁺. Si les cellules tumorales expriment une quantité d'antigène supérieure à ce seuil et si les cellules normales ne l'expriment pas, une réponse T CD8 spécifique pourrait avoir lieu. Cependant, une telle surexpression d'antigènes tumoraux est difficile à démontrer rigoureusement car cette différence d'expression entre cellule normale et cellule tumorale est difficile à délimiter. Parmi ces antigènes, la p53 mutée (Theoret, Cohen et al. 2008), le proto-oncogène HER2/Neu (Fisk, Blevins et al. 1995), et Hsp70 (Sherman and Gabai 2015) sont retrouvés.

Afin d'exercer leurs fonctions cytotoxiques de manière efficace, les LT CD8⁺ sont souvent aidés par d'autres composantes du système immunitaire, en particulier les lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺) dit *Helper* ou auxiliaires. En effet, les LT CD4⁺ de type 1 (Th1) participent à la destruction des tissus et le rejet des tumeurs en facilitant la fonction des LT CD8⁺ cytotoxiques (CTL).

3. Mécanismes d'échappement de la tumeur au système immunitaire

Dans la phase d'échappement, les cellules tumorales ont acquis la capacité de contourner la reconnaissance et/ou la destruction par les cellules immunitaires. L'échappement des tumeurs se produit grâce à de nombreux mécanismes différents, notamment : une reconnaissance immunitaire réduite (comme l'absence d'antigènes tumoraux immunogènes, ou la perte de molécules du CMH-I, ou de co-stimulation), une survie prolongée (comme l'expression accrue de STAT-3 ou de la molécule anti-apoptotique Bcl2), ou encore le développement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur (production de cytokines telles que les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le TGF- β , l'IDO (indoleamine 2,3 dioxygénase), et les récepteurs inhibiteurs comme PD-1, Tim-3 ou CTLA-4).

3.1. Mécanismes intrinsèques à la cellule tumorale

3.1.1. Reconnaissance immunitaire altérée

La capacité du système immunitaire à distinguer les cellules normales des cellules malignes est fondamentale pour une réponse antitumorale efficace et pour l'immunothérapie du cancer. Celle-ci repose au moins en partie, sur le fait que les cellules cancéreuses conservent une immunogénicité suffisante. Les tumeurs peuvent exprimer une variété d'antigènes non mutés et mutés qui ont le potentiel d'induire des réponses immunitaires spécifiques des tumeurs (listes des différents antigènes vue dans la partie 1.2.). Cependant, pour échapper au système immunitaire, les cellules tumorales peuvent perdre leur immunogénicité. La perte de cette immunogénicité peut survenir en raison de la pression exercée par le système immunitaire. Cela engendre la sélection de variants tumoraux qui n'expriment plus d'antigènes tumoraux puissants, ou qui acquièrent des défauts dans la présentation des antigènes (par exemple, perte de l'expression du CMH-I ou la dérégulation de la machinerie de présentation et d'apprêtement des antigènes, tels que la perte de la β -microglobuline ou de TAP1/TAP2 (*transporter associated with antigen processing*)) (Schreiber, Old et al. 2011).

3.1.2. Résistance ou une survie accrue des cellules tumorales

Des mutations ou le changement d'expression de certains gènes dans les cellules tumorales peuvent moduler la réponse immunitaire. Ainsi, des mutations du gène suppresseur de tumeur p53 ont été suggérées comme étant associées à des effets immunomodulateurs. En effet, la signalisation de p53 sauvage est corrélée avec le recrutement et l'activation de cellules immunitaires (Xue, Zender et al. 2007). Par conséquent, une réactivation de la voie p53 a permis une régression tumorale dans un modèle murin de carcinome hépatique. Ceci est causé par une expression accrue de chimiokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires (Iannello, Thompson et al. 2013). D'un point de vue clinique, une étude récente a établi une corrélation entre la signalisation de p53

sauvage, un microenvironnement inflammatoire et la présence de LT dans le cancer du sein triple négatif (Quigley, Silwal-Pandit et al. 2015). D'autres voies de signalisation d'oncogènes ayant un impact potentiel sur la réponse immunitaire existent, telle que la signalisation induite par STAT3. L'activation de cette voie dans les cellules tumorales a été associée à une progression tumorale (Pan, Wang et al. 2017). Ainsi la greffe de cellules tumorales avec une signalisation STAT3 active dans des souris, réduit l'expression de médiateurs pro-inflammatoires, tandis que l'injection d'une lignée tumorale exprimant un variant STAT3 dominant-négatif entraîne une expression accrue de ces molécules pro-inflammatoires, comme les chimiokines CCL5 et CXCL10 (Wang, Niu et al. 2004; Burdelya, Kujawski et al. 2005).

3.2. Microenvironnement tumoral

Bien que la sélection de variants tumoraux peu immunogènes ait pour conséquence le développement de mécanismes d'échappement tumoral, ceci n'explique pas pourquoi les tumeurs exprimant et présentant des épitopes immunogènes à leur surface ne sont plus éliminées par les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). La croissance des tumeurs immunogènes peut être le résultat du rôle critique de l'immunosuppression dans la promotion de l'échappement tumoral (Gajewski, Schreiber et al. 2013). En effet, les interactions complexes entre les populations de LT CD8⁺ effecteurs et les populations de cellules immunosuppressives entre autres, dictent les réponses immunitaires spécifiques aux tumeurs. Il est maintenant clair qu'au fur et à mesure que les tumeurs se développent, elles peuvent être infiltrées par différents sous-ensembles de cellules immunitaires comme les LT CD4⁺ régulateurs (Treg), les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les macrophages qui peuvent alors transformer le microenvironnement tumoral en un écosystème moins favorable pour la fonction des LT CD8⁺ effecteurs.

3.2.1. Les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs

Dans les états de tolérance, y compris lors de l'évasion tumorale, les Treg bloquent la prolifération, la survie et la fonction cytotoxique des LT CD8⁺ effecteurs par de multiples moyens (Vignali, Collison et al. 2008) (**Figure 2**). Les cellules Treg expriment le facteur de transcription FoxP3 (*forkhead box P3*) qui est nécessaire à leur développement et à l'expression de multiples gènes impliqués dans leurs fonctions régulatrices. Ces cellules expriment aussi constitutivement le récepteur à l'interleukine (IL)-2 (CD25 = IL-2R α). Ainsi la séquestration de l'IL-2 par les cellules Treg est un composant clé de leur fonction suppressive (Thornton and Shevach 1998; McNally, Hill et al. 2011). Les Tregs utilisent d'autres mécanismes de suppression, comme la séquestration des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) exercée par la molécule CTLA-4 (Wing, Onishi et al. 2008) et l'expression de cytokines inhibitrices

telles que le TGF- β (Gorelik and Flavell 2001; Nakamura, Kitani et al. 2001), l'IL-10 (Chaudhry, Samstein et al. 2011) et l'IL-35 (Collison, Workman et al. 2007). De plus, la production paracrine d'adénosine assurée par les ectonucléosidases CD39/CD73 des cellules Treg régule négativement la différenciation et la fonction des LT CD8⁺ effecteurs (Deaglio, Dwyer et al. 2007). Un mécanisme d'immunosuppression inattendu et étonnant par les Tregs a été aussi montré. Les Tregs auraient des capacités cytotoxiques et pourraient éliminer directement les LT CD8⁺. Ceci s'effectuerait grâce à la présence de granzyme B et de perforine dans les cellules Treg (Grossman, Verbsky et al. 2004). De plus, ce mécanisme semblerait contribuer à l'immunosuppression par les cellules Treg dans les tumeurs (Cao, Cai et al. 2007). Enfin, la sécrétion d'exosomes contenant des microARN est un autre mécanisme de l'immunosuppression effectué par les Treg (Okoye, Coomes et al. 2014). En résumé, les Tregs sont les acteurs principaux de l'immunosuppression dans les cancers. Leur présence au sein des tumeurs est souvent associée à un mauvais pronostic, et de nombreuses stratégies thérapeutiques sont en développement pour cibler cette population. Cependant, il est fort probable que de nombreux mécanismes d'immunosuppression par les Tregs restent à être découverts (Finotello and Trajanoski 2017; Zhou, Shao et al. 2017).

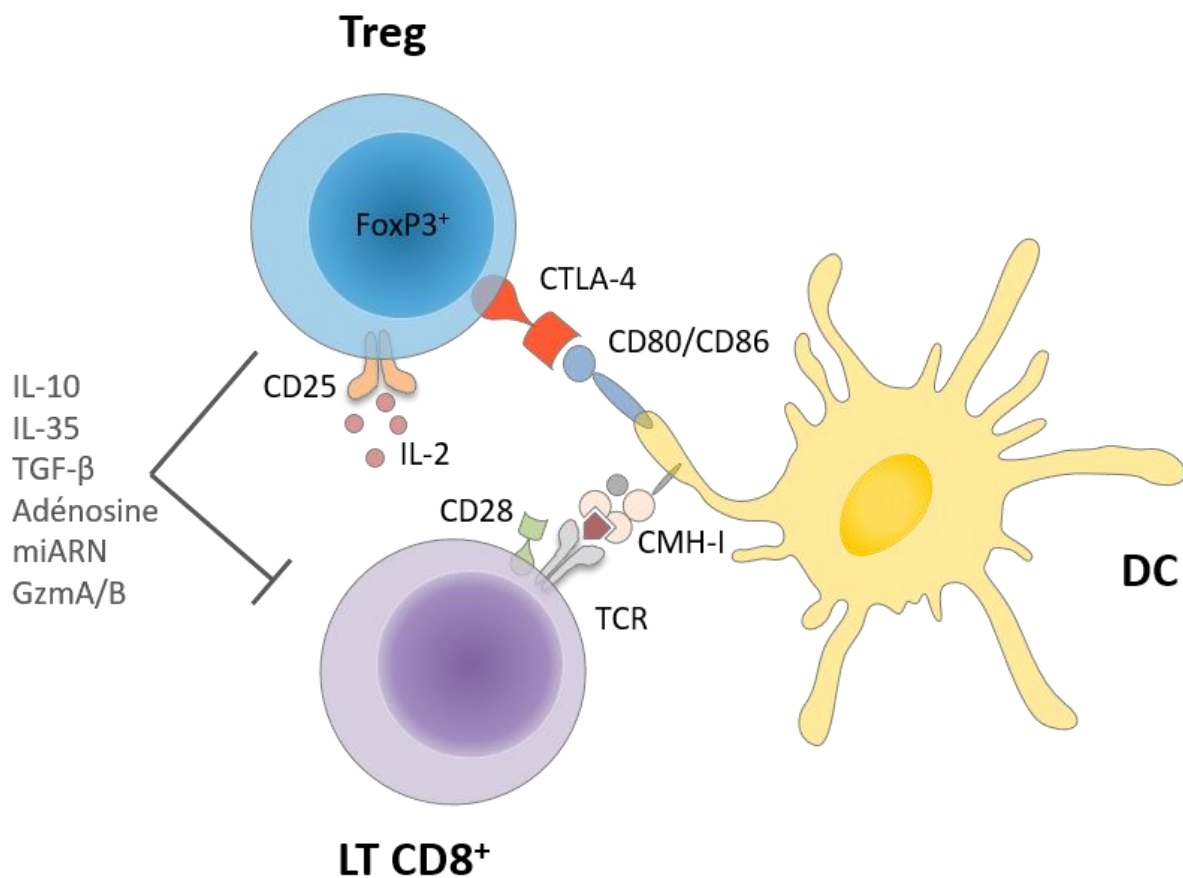


Figure 2 : Mécanismes de suppression par les lymphocytes T régulateurs

3.2.2. Les cellules myéloïdes suppressives

Les MDSC constituent une population morphologiquement et fonctionnellement hétérogène. Elles dérivent de cellules progénitrices de la moelle osseuse qui sont à différents stades de différenciation, allant du stade myéloïde précoce à un phénotype plus granulocytaire ou monocytaire. Ces cellules sont présentes en faibles quantités chez les individus sains, mais sont présentes en proportion élevée chez presque tous les patients atteints de cancers et chez les souris ayant une tumeur ou une inflammation (Gabrilovich, Bronte et al. 2007). Cette population induit une suppression à la fois de l'immunité antitumorale innée et adaptative en inhibant la fonctionnalité des LT CD8⁺ et CD4⁺, des cellules NK et NKT, et en bloquant la maturation des DC (Sinha, Clements et al. 2005; Serafini, Borrello et al. 2006; Yanagisawa, Exley et al. 2006). Les MDSC altèrent la fonction des LT par plusieurs mécanismes. Ceux-ci comprennent la production de cytokines immunosuppressives telles que le TGF- β et l'IL-10 (Li, Han et al. 2009) ; l'épuisement ou la séquestration des aa arginine ou cystéine, qui sont nécessaires à la fonction des LT (Srivastava, Sinha et al. 2010); la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de peroxy-nitrites qui inhibent les LT CD8⁺ en catalysant la nitrosylation du récepteur des cellules T (TCR), modifiant ainsi la réactivité du TCR et limitant sa capacité à répondre aux antigènes (Nagaraj, Gupta et al. 2007) ; et l'induction de Tregs (Huang, Pan et al. 2006).

3.2.3. Les macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages font partie du système immunitaire inné et jouent un rôle important dans toutes les étapes de l'immunité grâce au phénomène d'opsonisation. Il s'agit d'une population de cellules très hétérogène. Les macrophages peuvent contribuer à la destruction des tumeurs (type M1) ou faciliter la croissance de celles-ci et le développement de métastases (type M2), selon leur phénotype. La plupart des tumeurs sont infiltrées par un grand nombre de macrophages, qui en général présentent un phénotype de type M2. Ces macrophages associés aux tumeurs (TAMs de type 2) peuvent inhiber l'immunité antitumorale suite à la production de TGF- β et d'IL-10, et peuvent aussi favoriser le développement stromal et l'angiogenèse grâce à la sécrétion de facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF (*Platelet-derived growth factor*)) (Sica, Larghi et al. 2008). En effet, dans un modèle de tumeur mammaire spontanée chez la souris, la transition du phénotype pré-malin au phénotype malin est associée à une formation accrue de vaisseaux sanguins, et l'élimination des TAMs bloque la néoangiogenèse, tandis que l'infiltration précoce de TAMs favorise celle-ci (Lin, Li et al. 2006). De plus, dans ce même modèle, le développement de métastases serait en lien avec la présence de TAMs. En effet, il a été montré que les TAMs favorisent l'intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins environnants (Wyckoff, Wang et al. 2007). Dans le cancer de l'ovaire humain, les TAMs favorisent également la progression tumorale en bloquant

l'activation des LT CD8⁺ spécifiques de la tumeur suite à l'expression de la molécule B7-H4, un régulateur négatif de l'activation des LT (Gomi, Kimura et al. 1991).

3.3. Mécanismes inhérents aux Lymphocytes T CD8⁺

La transition vers la phase d'échappement ne dépend pas seulement du contrôle extrinsèque exercé par les cellules tumorales et les cellules immunosuppressives telles que les Treg et les MDSC, mais aussi par la régulation intrinsèque de la fonction cytotoxique et le recrutement dans la tumeur des LT CD8⁺.

3.3.1. Déficit de recrutement à la tumeur

L'observation selon laquelle la présence d'un infiltrat de LT CD8⁺ est un indicateur fort, sinon le plus puissant, d'une réponse immunitaire antitumorale efficace a été introduite par le concept du « score immunitaire » (Ropponen, Eskelinen et al. 1997; Naito, Saito et al. 1998; Galon, Costes et al. 2006). Le principal récepteur aux chimiokines responsable de l'infiltration des LT CD8⁺ à la tumeur serait CXCR3, avec ses ligands CXCL9 et CXCL10 (Harlin, Meng et al. 2009; Bedognetti, Spivey et al. 2013). Ce récepteur est largement et rapidement induit à la surface des LT CD8⁺ après activation (Groom and Luster 2011), et son expression est sous le contrôle du facteur de transcription T-bet (Taqueti, Grabie et al. 2006). L'expression de ce récepteur et de ses ligands est significativement réduite dans les tumeurs peu infiltrées par des LT CD8⁺ (Bedognetti, Spivey et al. 2013). Le déficit de production des chimiokines CXCL9 et CXCL10 peut être causé par la méthylation des promoteurs des gènes codants ces protéines dans les cellules tumorales (Peng, Kryczek et al. 2015). Comme toutes les tumeurs n'ont pas ces modifications, il est également concevable que les composantes immunitaires du stroma tumoral puissent contribuer aussi au recrutement des LT CD8⁺. En effet, l'expression de CXCL9 et CXCL10 est dépendante de la présence d'interféron (IFN) de type I, dont la source peut être les macrophages ou les LB (Woo, Fuertes et al. 2014). De plus, l'absence de certaines DC serait aussi associée à l'absence des LT CD8⁺, suggérant que les DC au sein de la tumeur pourraient également contribuer au recrutement de ces cellules (Lanitis, Dangaj et al. 2017).

3.3.2. Inhibition de la fonction cytotoxique

La sécrétion d'IFN- γ par les LT CD8⁺ spécifiques de la tumeur entraîne une régulation positive de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales (Taube, Anders et al. 2012; Spranger, Spaapen et al. 2013). PD-L1 est un des ligands du récepteur PD-1 (Keir, Butte et al. 2008). Ce récepteur est couramment exprimé sur les LT CD8⁺ activés, ainsi que sur les LT CD8⁺ « épuisés » (= dysfonctionnels) lors d'une infection virale chronique, mais aussi dans le cancer (Wherry 2011), et contribue à l'inhibition des fonctions effectrices de ces cellules. En effet, l'engagement du récepteur PD-1 avec

ses ligands induit un signal inhibiteur, bloquant ainsi la signalisation du TCR et la fonctionnalité des LT CD8⁺ (Freeman, Long et al. 2000). Plusieurs récepteurs inhibiteurs (iRs) ont été par la suite découverts tels que CTLA-4, Tim-3 et LAG-3 (Odorizzi and Wherry 2012). Tous ces récepteurs sont impliqués dans l'inhibition des fonctions effectrices des LT CD8⁺, et sont associés au développement d'un phénotype dysfonctionnel/épuisé de ces cellules. La présence de cellules T CD8⁺ dysfonctionnelles, qui ne sont donc plus capables de lyser les cellules cibles, de produire de l'IL-2 ou de proliférer, ont été identifiées dans le microenvironnement tumoral (Baitsch, Baumgaertner et al. 2011; Gajewski, Schreiber et al. 2013; Spranger, Koblish et al. 2014). Ainsi la dérégulation de la fonction des LT CD8⁺ peut être considérée comme un mécanisme supplémentaire d'inhibition immunitaire intrinsèque, qui altère le développement d'une réponse immunitaire antitumorale efficace.

Cette caractéristique des LT CD8⁺ sera approfondie dans la partie suivante. J'approfondirai aussi les immunothérapies anticancéreuses mises en place pour lever l'inhibition des LT CD8⁺ par l'utilisation des anticorps bloquants spécifiques de ces iRs, appelés « checkpoint immunitaires ».

II. Du combat à l'épuisement des lymphocytes T CD8⁺

1. Développement et acquisition des fonctions effectrices

Les LT CD8⁺ sont un composant clé de la réponse immunitaire adaptative, grâce à leur capacité à éliminer spécifiquement des cellules transformées ou infectées par un virus. Ces cellules contribuent ainsi à l'élimination des cellules cancéreuses et au contrôle des infections virales aiguës ou de la charge virale durant des infections chroniques. Les LT CD8⁺ sont éduqués dans le thymus pour acquérir la tolérance au soi lors de la sélection thymique positive et négative. Après avoir subi ce processus, les LT CD8⁺ naïfs entrent dans la circulation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires grâce aux chimiokines CCL19 et CCL21. Lors d'une réponse primaire, les DC sensibilisées par un antigène migrent dans les ganglions drainants l'infection et activent les LT CD8⁺ naïfs. Trois signaux sont alors nécessaires pour l'activation des LT CD8⁺. Le premier signal étant l'interaction du TCR avec le CMH-I chargé avec un peptide antigénique à la surface des DC matures. Le deuxième signal est, quant à lui déclenché par l'interaction des molécules de co-stimulation exprimées à la surface des LT CD8⁺ avec leurs ligands sur les DC (ex: interaction de CD28 avec CD80 ou CD86) (Chen and Flies 2013). Enfin, le troisième signal est induit par les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12. L'activation des LT CD8⁺ leur permet de proliférer ainsi que de se différencier.

Quatre populations différentes de LT CD8⁺ peuvent être définies : les LT naïfs, les LT effecteurs (T_{eff}), les LT effecteurs/mémoires (T_{EM}), et les LT mémoires centraux (T_{CM}). Chaque population présente un état d'activation et de différenciation distinct associé à diverses caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques (Romero, Zippelius et al. 2007) (**Figure 3**).

Le processus de différenciation des T_{eff} s'accompagne d'une reprogrammation transcriptionnelle, épigénétique et métabolique, ainsi que de l'acquisition de caractéristiques essentielles, telles que l'activité cytotoxique, le *homing* tissulaire et une expansion clonale. Cette différenciation est sous le contrôle de facteurs de transcription, tels que T-bet (*Tbx21*) et Eomesodermin (EOMES) qui sont responsables de l'expression de la perforine (PFN), des granzymes (Gzms) et de l'IFN- γ (Pearce, Mullen et al. 2003; Glimcher, Townsend et al. 2004; Kaech and Cui 2012). Une autre caractéristique des T_{eff} est la perte du potentiel de domiciliation au niveau des ganglions lymphatiques, due à une diminution d'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 et de la L-selectine CD62L. À ce stade, les LT CD8⁺ acquièrent la capacité de migrer au niveau des tissus et des sites inflammatoires ou tumoraux, guidés par des chimiokines (Masopust and Schenkel 2013). Après le pic d'expansion des T_{eff}, la résolution de l'inflammation et la clairance de l'antigène, la plupart de ces cellules activées meurent (phase de contraction). Cependant, un sous-ensemble de LT persiste et transite dans le *pool* de LT mémoire qui contribue à l'immunité tout au long de la vie. En effet, on distingue généralement

deux sous-populations de T_{eff} ; les MPEC (*Memory Precursor Effector Cells*) qui peuvent se différencier en cellules mémoires et les SLEC (*Short-Lived Effector Cells*) qui ne se différencient pas en cellules mémoires et qui meurent par l'apoptose (Sarkar, Kalia et al. 2008). Les LT mémoires régulent négativement une grande partie du programme d'activation des T_{eff} , tout en conservant la capacité de réactiver rapidement les fonctions cytotoxiques lors d'une deuxième exposition à l'antigène (Masopust and Schenkel 2013). En outre, les LT mémoires développent une propriété capitale, celle de l'auto-renouvellement indépendamment de l'antigène. Il s'agit d'un type de division lente semblable à celle des cellules souches qui est pilotée par l'IL-7 et l'IL-15. Il existe une diversité et une complexité considérables de sous-ensembles de cellules T mémoire à la suite d'infections aiguës ou de vaccinations (T_{EM} , T_{CM} , et LT mémoire résidents dans le tissu (T_{RM})).

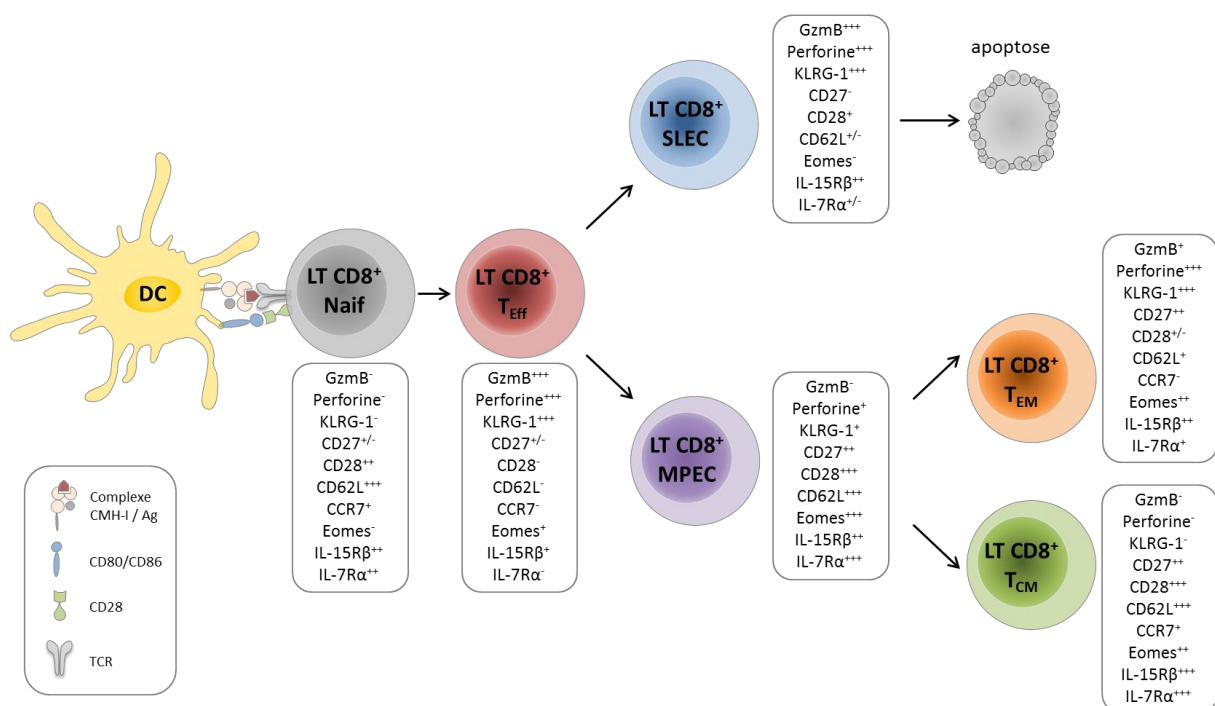


Figure 3 : Phénotype et caractéristiques des différentes populations de lymphocytes T CD8⁺

2. Reconnaissance et destruction de la cible

Après leur migration au site tumoral, les LT CD8⁺ activés peuvent finalement effectuer leur fonction cytotoxique. Ainsi, lors de l'engagement du TCR avec le complexe peptide/CMH-I présenté à la surface de certaines cellules tumorales, les LT CD8⁺ arrêtent leur migration, se polarisent et forment une interaction spécialisée avec la cellule cible. Cette zone de contact entre le LT et sa cible est appelée synapse immunologique (SI) (Dustin, Bromley et al. 1997; Mempel, Henrickson et al. 2004). La SI intègre trois grandes catégories de récepteurs à la surface du LT : le TCR, des molécules d'adhésion telle que LFA-1, et des molécules co-stimulatrices et inhibitrices, telles que CD28 et CTLA-4.

A la suite de la formation de la SI, la mort de la cellule cible peut être alors induite. Deux types de mécanismes cytotoxiques peuvent être effectués par les LT CD8⁺, la voie PFN/Gzm dépendante du calcium (Ca²⁺) et la voie des récepteurs à domaine de mort de la famille du récepteur au TNF (*tumor necrosis factor*), tels que Fas/FasL, Trail/TrailR, TNFR/TNF (Wohlleber, Kashkar et al. 2012). Ces deux voies déclenchent la mort par apoptose de la cellule cible, mais la voie PFN/Gzm est prépondérante et généralement plus rapide. La mise à mort par la voie PFN/Gzm débute par une lésion membranaire et une lyse conduisant à l'introduction de Gzms dans le cytoplasme cellulaire de la cellule cible (Keefe, Shi et al. 2005). Ces protéines sont gardées sous forme active à l'intérieur de granules cytotoxiques (GC) empêchant ainsi leur fonction au sein du LT CD8⁺. Les Gzms sont des sérine-protéases incluant 5 membres (A, B, H, M et K), dont les plus abondantes sont les Gzm-A et les Gzm-B. Les Gzms sont initialement synthétisés sous la forme de pro-enzymes qui sont par la suite activées par clivage protéolytique induit par la Cathepsine C, présente au niveau des GC. La perforine est une protéoglycane présentant une analogie de structure avec la protéine C9 du complément. Elle peut ainsi former des pores par multimérisation dans la membrane de la cellule cible de manière dépendante du calcium (Tschopp, Masson et al. 1986), et permettre ainsi l'internalisation des Gzms. Une fois libéré dans le cytoplasme, le Gzm-B clive un très grand nombre de substrats et active ainsi les voies d'apoptose dépendante et indépendante des caspases (Chowdhury and Lieberman 2008). Les CTLs libèrent également des cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α et le TNF- β , qui contribuent à la défense de l'hôte (Tau, Cowan et al. 2001; Calzascia, Pellegrini et al. 2007). Ainsi, l'IFN- γ induit une expression accrue du CMH-I et d'autres molécules impliquées dans le chargement peptidique sur les molécules de CMH-I nouvellement synthétisées. L'IFN- γ permet aussi l'activation des macrophages, engendrant leur recrutement au niveau des sites d'infection à la fois comme CPA et comme cellules effectrices.

3. Épuisement des lymphocytes T CD8⁺

3.1. Définition

Lors d'infections virales aiguës, les LT naïfs sont activés par l'antigène, les signaux de co-stimulation et le contexte inflammatoire. Ils prolifèrent ainsi de façon exponentielle pour former des populations T_{eff}. Alors que la majorité de ces cellules meurt après éradication de l'infection, une partie de ces cellules peut donner naissance à des LT CD8⁺ mémoires, permettant des réponses rapides et robustes en cas d'une seconde infection. En revanche, au cours d'infections chroniques virales, l'antigène et l'inflammation persistent après la phase effectrice. Au fur et à mesure que l'infection progresse et que la stimulation des LT CD8⁺ se poursuit, les fonctions effectrices des LT CD8⁺ s'atténuent de manière hiérarchique et ces cellules finissent par s'épuiser et devenir

dysfonctionnelles (Wherry 2011). Bien que l'épuisement des LT CD8⁺ ait d'abord été décrit dans le contexte d'une infection virale chronique chez la souris (Gallimore, Glithero et al. 1998; Zajac, Blattman et al. 1998), il a également été observé chez l'homme lors d'infections comme celles par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'hépatite C (Shin and Wherry 2007), ainsi que dans le cancer (Fourcade, Sun et al. 2010; Wherry 2011; Schietinger and Greenberg 2014).

3.2. Facteurs induisant l'épuisement des lymphocytes T CD8⁺

Une question centrale a été de déterminer les causes de l'épuisement des LT CD8⁺. Ainsi, il a été démontré que l'épuisement des LT CD8⁺ est engendré par la présence persistante d'un microenvironnement inflammatoire, d'autres populations lymphocytaires telles que les LT CD4⁺, les Treg et les LB, ainsi que de signaux inhibiteurs provenant de cytokines, d'IRs et de récepteurs co-stimulateurs/activateurs (aRs) (**Figure 4**).

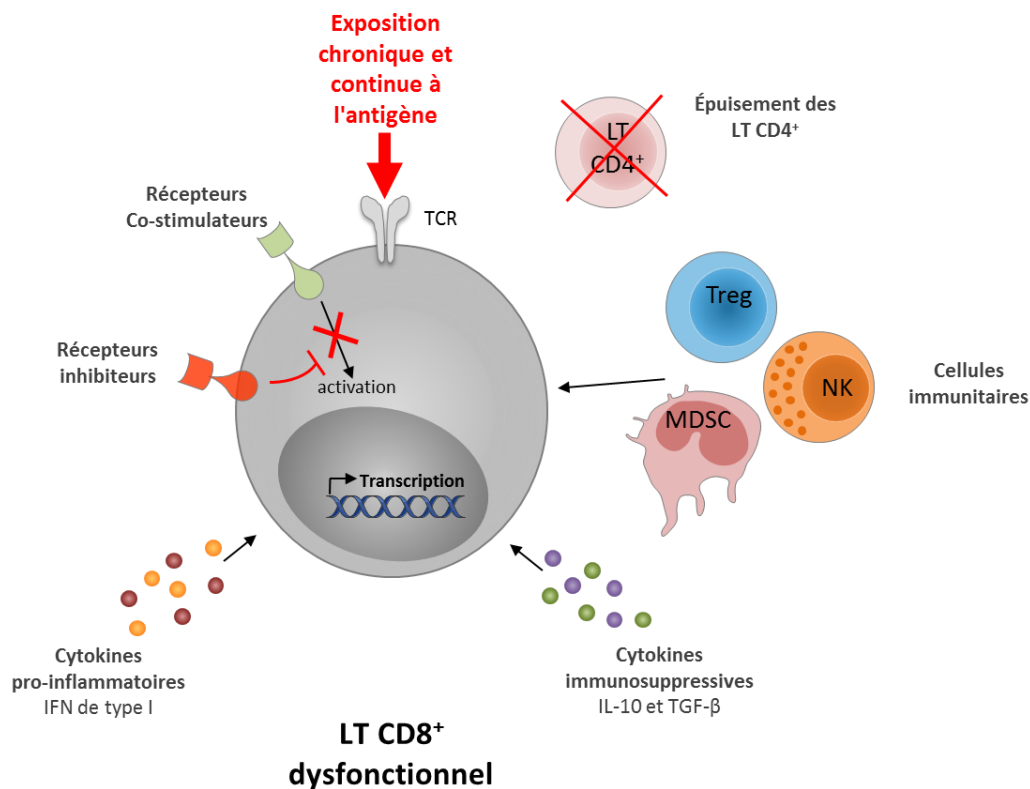


Figure 4 : Mécanismes induisant l'épuisement des lymphocytes T CD8⁺

3.2.1. Exposition persistante à l'antigène

Une caractéristique clé de l'épuisement des LT CD8⁺ est l'exposition chronique et continue à l'antigène. Les premières études utilisant le modèle du virus de la chorioméningite lymphoïde chronique (LCMV) ont démontré que la gravité de l'épuisement aboutissant à la délétion des cellules T spécifiques de l'antigène, était corrélée avec le niveau de stimulation par l'antigène (Wherry,

Blattman et al. 2003). L'importance de la persistance de l'antigène dans l'épuisement a également été confirmée dans d'autres modèles murins et dans l'infection humaine par le VIH-1 (Streeck, Brumme et al. 2008; Blackburn, Shin et al. 2009; Bucks, Norton et al. 2009). En effet, si les LT CD8⁺ activés pendant l'infection par une souche chronique de LCMV sont retirés de cette stimulation antigénique persistante (environ 1 semaine après l'infection), ces cellules peuvent se différencier en LT CD8⁺ mémoires pleinement fonctionnels. Cependant, si ces cellules sont exposées à l'antigène de manière persistante pendant 2 à 4 semaines, l'épuisement des LT CD8⁺ s'installe et ces cellules ne retrouvent plus une différenciation normale vers un phénotype mémoire par simple retrait à l'exposition de l'antigène (Brooks, McGavern et al. 2006; Angelosanto, Blackburn et al. 2012). De plus, des voies de signalisation du TCR, y compris celles dépendantes du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT) et l'homologue Sprouty 2 (SPRY2), sont impliquées dans l'épuisement des LT, ce qui appuie le rôle de la stimulation continue du TCR dans l'épuisement de ces cellules (Agnellini, Wolint et al. 2007; Chiu, Shan et al. 2014; Martinez, Pereira et al. 2015). Ainsi, le niveau et la durée de la stimulation antigénique semblent être des facteurs clés qui mènent à l'épuisement des LT CD8⁺ et qui corrélerent avec la gravité du dysfonctionnement de ces cellules pendant les infections chroniques et les cancers.

3.2.2. Les récepteurs inhibiteurs

Les iRs exercent des voies de régulation négatives qui contrôlent l'auto-réactivité et l'immunopathologie (Sharpe, Wherry et al. 2007). Bien que les iRs s'expriment de façon transitoire à la surface des T_{eff} suite à leur activation, une expression plus élevée et soutenue de ces récepteurs est une caractéristique des cellules épuisées. La voie de signalisation inhibitrice exercée par le récepteur PD-1 en réponse à la liaison d'un de ces ligands (PD-L1 et/ou PD-L2) a été la plus étudiée. Cependant, en plus de PD-1, les LT épuisés expriment une large panoplie d'iRs à leur surface, tels que LAG-3, 2B4 (CD244), CD160, TIM-3, CTLA-4 (Blackburn, Shin et al. 2009), et plusieurs mécanismes par lesquels ces iRs régulent la fonction des LT CD8⁺ ont été mis en évidence (Odorizzi and Wherry 2012; Schietinger and Greenberg 2014). Premièrement, les iRs, par leur domaine extracellulaire, peuvent séquestrer des ligands pour les récepteurs co-stimulateurs, empêchant ainsi les LT CD8⁺ de recevoir les signaux d'activation nécessaires à une activation complète. Par exemple, l'iR CTLA-4 se lie avec une affinité 10 fois plus grande aux ligands CD80 et CD86, empêchant physiquement CD28 d'interagir avec eux (Pentcheva-Hoang, Egen et al. 2004). Deuxièmement, ces iRs, par le recrutement de phosphatases et la modulation de médiateurs intracellulaires, peuvent provoquer une atténuation locale et transitoire des signaux positifs des récepteurs activateurs tels que le TCR et les aRs comme CD28 (Parry, Chemnitz et al. 2005; Yokosuka, Takamatsu et al. 2012; Clayton, Haaland et al. 2014). Ces récepteurs peuvent aussi induire l'expression de gènes inhibiteurs. Par exemple la signalisation

de PD-1 induit l'expression et l'activation du facteur de transcription BATF (*Basic leucine zipper transcription factor ATF-like*) qui inhibe la prolifération et la sécrétion d'IL-2 des LT CD8⁺ (Quigley, Pereyra et al. 2010).

Généralement, plus le nombre d'iRs co-exprimés par les LT CD8⁺ est élevé, plus l'épuisement est grave et irréversible. En effet, bien que l'expression de PD-1 ou d'autres iRs ne soit pas indicative de l'épuisement, la co-expression d'iRs multiples est une caractéristique fondamentale. Il a été suggéré que chaque iR possède des voies d'inhibition qui ne sont pas redondantes. En effet, ces molécules inhibitrices proviennent de diverses familles structurales, se lient à des ligands avec des modèles d'expression distincts et ont des domaines de signalisation intracellulaire différents.

En plus des iRs, il est devenu clair que les aRs tels que CD28, 4-1BB, OX40 et CD40, sont aussi impliqués dans l'épuisement des LT CD8⁺ (Odorizzi and Wherry 2012). Ainsi, la désensibilisation de la signalisation de voie de co-stimulation par la perte de molécules adaptatrices peut servir de mécanisme de dysfonctionnement des LT CD8⁺. Par exemple, l'expression de l'adaptateur associé à la signalisation du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR), TRAF1, est régulé négativement dans les LT épuisés lors de l'infection par le VIH et le LCMV (Wang, McPherson et al. 2012).

Les mécanismes moléculaires, le profil d'expression et le ciblage thérapeutique de ces récepteurs seront vus d'une manière plus approfondie dans la partie III.

3.2.3. Les médiateurs solubles

Les molécules solubles correspondent à une troisième classe de signaux qui régulent l'épuisement des LT CD8⁺. Elles comprennent les cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β , et les cytokines inflammatoires comme les IFN de type I et l'IL-6.

La voie du récepteur à l'IL-10 est importante dans l'épuisement des LT CD8⁺. Ainsi le blocage de l'IL-10 restaure la fonction des LT CD8⁺, et améliore le contrôle de la charge virale pendant des infections chroniques, démontrant que l'IL-10 favorise l'épuisement des LT CD8⁺ (Brooks, Trifilo et al. 2006; Ejrnaes, Filippi et al. 2006). Des études portant sur l'infection par le LCMV chez la souris et le VIH chez l'homme ont montré que de nombreux types cellulaires peuvent être la source d'IL-10 pendant une infection chronique, comprenant les DC, les monocytes et/ou les LT CD4⁺ (Said, Dupuy et al. 2010; Shaked, Hofseth et al. 2012). Le blocage simultané de l'IL-10 et de la voie PD-1 chez la souris inverse de manière synergique l'épuisement des LT CD8⁺ et améliore le contrôle viral, appuyant le rôle de l'IL-10 dans le contrôle de l'épuisement des LT CD8⁺ (Brooks, Ha et al. 2008). Malgré la preuve évidente que le blocage de l'IL-10 annule l'épuisement, les événements

moléculaires en aval de la signalisation de l'IL-10 qui façonnent l'épuisement des LT, restent à définir avec plus de précision.

Le TGF- β a également été impliqué dans l'épuisement des LT CD8⁺. La phosphorylation de SMAD2 dans les LT CD8⁺ est augmentée pendant une infection chronique par le LCMV comparée à une infection aiguë, suggérant un rôle de la signalisation du TGF- β . L'inhibition *in vivo* de la signalisation du TGF- β dans les LT CD8⁺ par l'expression d'un récepteur dominant-négatif améliore la fonction des LT CD8⁺ (Tinoco, Alcalde et al. 2009). Cependant, l'administration systémique d'un inhibiteur ou d'un anticorps bloquant du TGF- β est peu bénéfique (Boettler, Cheng et al. 2012; Garidou, Heydari et al. 2012). Par conséquent, des études plus approfondies doivent être effectuées pour la compréhension de cette voie immunorégulatrice dans la conduite de l'épuisement des LT CD8⁺.

Les IFNs de type I (IFN- α et IFN- β) sont des cytokines inflammatoires qui ont des fonctions antivirales essentielles au début des infections aiguës. La signalisation induite par l'IFN- α / β fournit un troisième signal clé pour la différenciation des LT CD8⁺ (Curtsinger and Mescher 2010). Cependant, la signalisation de l'IFN de type I facilite la persistance virale lors d'infection chronique, en favorisant la suppression immunitaire et la destruction des tissus lymphoïdes. Ainsi, le blocage de cette voie au cours d'une infection chronique chez la souris améliore le contrôle de la réplication virale et empêche l'épuisement des LT CD8⁺ (Teijaro, Ng et al. 2013; Wilson, Yamada et al. 2013). De plus, le blocage prématuré de la voie de signalisation de l'IFN- α / β (1-2 jours après l'infection) empêche le développement ultérieur de l'épuisement des LT CD8⁺, suggérant un rôle précoce dans la « programmation » de l'épuisement. L'effet de l'IFN- α / β semblerait fonctionner via les LT CD4⁺, bien que le mécanisme précis reste à définir. En parallèle, l'IFN- α / β peut induire plusieurs molécules immunorégulatrices, dont l'IL-10, PD-L1 et l'IDO, dans les CPA et d'autres types de cellules régulant négativement la fonction des LT CD8⁺ (Ivashkiv and Donlin 2014).

3.2.4. Les cellules immunitaires

Le nombre des cellules Treg peut être augmenté chez l'homme durant des infections chroniques et des cancers, pouvant ainsi limiter les fonctions effectrices des LT CD8⁺ (Veiga-Parga, Sehrawat et al. 2013). Toutefois, il n'est pas encore clair si les cellules Treg peuvent directement causer l'épuisement des LT CD8⁺, mais comme ces cellules sont une source d'IL-10, de TGF- β et d'autres cytokines suppressives (par exemple, l'IL-35) (Veiga-Parga, Sehrawat et al. 2013), un tel scénario serait probable. Cependant, les mécanismes par lesquels les cellules Treg affectent le développement de l'épuisement des LT CD8⁺ demeurent incomplets. Récemment, une interaction entre les cellules Treg et la voie de signalisation de PD-1 dans la régulation des LT CD8⁺ épuisés a été démontré dans le

modèle d'infection chronique LCMV. En effet, la déplétion des cellules Treg et le blocage simultané de la signalisation de PD-1 ont un effet hautement synergique sur le contrôle viral et l'inversion de l'épuisement (Penaloza-MacMaster, Kamphorst et al. 2014). En plus des cellules Treg, d'autres types cellulaires, comme les MDSC (Goh, Narayanan et al. 2013; Ng, Snell et al. 2013) et les cellules NK (Waggoner, Cornberg et al. 2011) peuvent influencer la persistance virale pendant les infections chroniques et favoriser directement ou indirectement l'épuisement des LT CD8⁺.

En plus d'un rôle possible pour les cellules Treg et les autres populations immunitaires cités précédemment, les signaux positifs provenant de cellules immunitaires sont cruciaux pour éviter l'épuisement des LT CD8⁺. Il est bien connu que la perte de l'aide des LT CD4⁺ pendant la persistance d'agents pathogènes peut être à l'origine des réponses défectueuses des LT CD8⁺ ou y contribuer. Ainsi, l'épuisement des LT CD4⁺ dans le modèle d'infection chronique LCMV entraîne l'échec du confinement de l'infection et provoque un épuisement des LT CD8⁺ plus grave (Matloubian, Concepcion et al. 1994). Lors de l'infection par le VIH, la perte des LT CD4⁺ est associée à un épuisement accru des LT CD8⁺ et à la progression de la maladie. Ceci serait dû à un facteur clé, l'IL-21, produit par les LT CD4⁺ pendant les infections chroniques, dont l'absence accentue l'épuisement des LT CD8⁺ pendant l'infection chronique par le LCMV (Elsaesser, Sauer et al. 2009; Frohlich, Kisielow et al. 2009; Yi, Du et al. 2009). Des observations similaires ont été réalisées lors de l'infection par le VIH (Chevalier, Julg et al. 2011; Williams, Bansal et al. 2011). Cependant, le rôle exact de l'IL-21 dans la limitation de l'épuisement des LT CD8⁺ reste à déterminer.

À bien des égards, les facteurs qui favorisent et maintiennent l'épuisement des LT CD8⁺ sont encore en cours de caractérisation. À mesure que d'autres paramètres de régulation seront découverts, il sera nécessaire de disséquer comment ces mécanismes individuels s'enchevêtrent entre eux pour mieux comprendre la cinétique d'apparition et l'installation de l'épuisement des LT CD8⁺. Par exemple, des analyses de l'expression génique suggèrent que des défauts métaboliques se manifestent dans les LT épuisés (Wherry, Ha et al. 2007). Plusieurs études récentes ont montré l'implication de changements dans le métabolisme cellulaire et de la voie de signalisation de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) dans la génération des LT CD8⁺ effecteurs et de la mémoire cellulaire (Araki, Turner et al. 2009; Delgoffe, Kole et al. 2009). Il serait donc intéressant de déterminer comment ces voies influencent la qualité des réponses des LT CD8⁺ pendant les infections chroniques ou le cancer, et de continuer à caractériser les facteurs contribuant à l'épuisement des LT CD8⁺.

3.3. Caractéristiques moléculaires et phénotypiques

Lors d'infections virales chroniques et de cancers, qui impliquent une exposition persistante aux antigènes et/ou à une inflammation, le programme de différenciation en LT mémoires est sensiblement modifié, et aboutit à l'apparition de LT CD8⁺ dysfonctionnels. Cet état de différenciation altéré se caractérise, par la perte progressive et hiérarchique des fonctions effectrices, l'augmentation de l'expression d'iRs multiples, l'expression de facteurs de transcription fonctionnels clés, des dysfonctionnements métaboliques et une incapacité à passer à la quiescence et à acquérir une réponse mémoire (Wherry 2011; Doering, Crawford et al. 2012; Schietinger and Greenberg 2014). Généralement, des fonctions telles que la production d'IL-2 et la prolifération des LT CD8⁺, sont perdues très tôt ; ceci est suivi par des défauts dans la production d'IFN- γ , de TNF et de chimiokines, ainsi que dans la dégranulation. L'épuisement des LT CD8⁺ s'accompagne également d'une augmentation progressive de la quantité et de la diversité des iRs, comme PD-1, CTLA-4, Tim-3, LAG-3, 2B4, CD160 et TIGIT (Wherry 2011; Schietinger and Greenberg 2014). En fin de compte, si la gravité ou la durée de l'infection est élevée ou prolongée, les LT CD8⁺ spécifiques du virus peuvent être perdues (« délétion ») (**Figure 5**). De plus, les LT CD8⁺ dysfonctionnels/épuisés présentent un programme transcriptionnel distinct de celui des LT CD8⁺ effecteurs ou mémoires (Wherry, Ha et al. 2007). En effet, des études récentes fondées sur des approches génomiques ont montré des changements majeurs dans l'expression de facteurs de transcription, de molécules de signalisation, de récepteurs de cytokines et de chimiokines, et de gènes impliqués dans le métabolisme sous-jacents à l'épuisement des LT (Wherry, Ha et al. 2007; Niles, Yeh et al. 2013). Ainsi, en plus des études phénotypiques et fonctionnelles, des analyses génomiques appuient également le concept selon lequel les LT dysfonctionnels représentent un état unique de différenciation des LT CD8⁺. Bien que des progrès considérables aient été réalisés dans l'identification des facteurs de transcription importants dans l'épuisement lymphocytaire, à ce jour aucun facteur de transcription spécifique aux LT CD8⁺ épuisés n'a été identifié. Néanmoins, en plus de T-bet et EOMES, les facteurs de transcription BLIMP-1, NFAT, BATF, VHL, FOXO1, IRF4 et FOXP1 ont été décrits pour être impliqués dans l'épuisement de ces cellules (Shin, Blackburn et al. 2009; Quigley, Pereyra et al. 2010; Kao, Oestreich et al. 2011; Doedens, Phan et al. 2013; Staron, Gray et al. 2014; Stephen, Rutkowski et al. 2014; Martinez, Pereira et al. 2015; Man, Gabriel et al. 2017). Par exemple, durant l'infection par le LCMV, l'épuisement des LT CD8⁺ est causé, en plus de la stimulation antigénique persistante, par le facteur de transcription IRF4, qui induit l'expression d'iRs, tel que PD-1, et inhibe le facteur de transcription TCF-1 qui est important pour la différenciation en cellules mémoires. La diminution de l'expression de IRF4 permet de restaurer les propriétés fonctionnelles et métaboliques des LT CD8⁺ spécifiques de l'antigène, et la formation d'une réponse mémoire (Man, Gabriel et al. 2017). Il est probable que

d'autres facteurs de transcription impliqués restent à être identifiés. Un concept clé qui a émergé, cependant, est que même si ces facteurs de transcription peuvent avoir des rôles dans plusieurs populations de LT (effecteur, mémoire et épuisé/dysfonctionnel), le modèle d'expression, les gènes contrôlés et la manière avec laquelle ces facteurs de transcription agissent peuvent être distincts dans les LT CD8⁺ dysfonctionnels par rapport aux autres sous-ensembles de LT. En d'autres termes, les facteurs de transcription effectueraient des fonctions spécifiques au statut d'épuisement. Par exemple, alors que EOMES est impliqué dans le contrôle de la quiescence et l'homéostasie des T_{CM} après une infection aiguë (Banerjee, Gordon et al. 2010), au cours d'une infection chronique EOMES contrôle plutôt la formation d'un sous-ensemble de LT CD8⁺ dysfonctionnels (non-quiescents) (Paley, Kroy et al. 2012). Cette implication différentielle des facteurs de transcription en fonction du contexte a été approfondie à l'aide d'une analyse du réseau transcriptionnel qui a démontré que les mêmes facteurs de transcription peuvent avoir des fonctions différentes dans les LT CD8⁺ mémoires par rapport aux cellules T CD8⁺ épuisés (Wherry 2011). L'épigénétique fournirait le contexte dans lequel les facteurs de transcription fonctionnent, et par conséquent leur rôle dans les différentes populations de LT CD8⁺.

Récemment, neuf populations distinctes de LT CD8⁺ épuisés ont été identifiées lors d'infections chroniques et de cancers chez l'homme, en se basant sur les caractéristiques citées ci-dessus, permettant ainsi de définir la sévérité de l'épuisement (Bengsch, Ohtani et al. 2018). Cette stratification va permettre une meilleure compréhension de l'épuisement des cellules T CD8⁺ et des mécanismes immunomodulateurs lors de l'infection chronique, l'auto-immunité et le cancer. Cependant, la poursuite de la compréhension de l'épuisement des LT CD8⁺ doit s'effectuer car de nombreuses questions restent sans réponses, en particulier les liens entre les différents facteurs induisant l'épuisement ainsi que leurs mécanismes moléculaires.

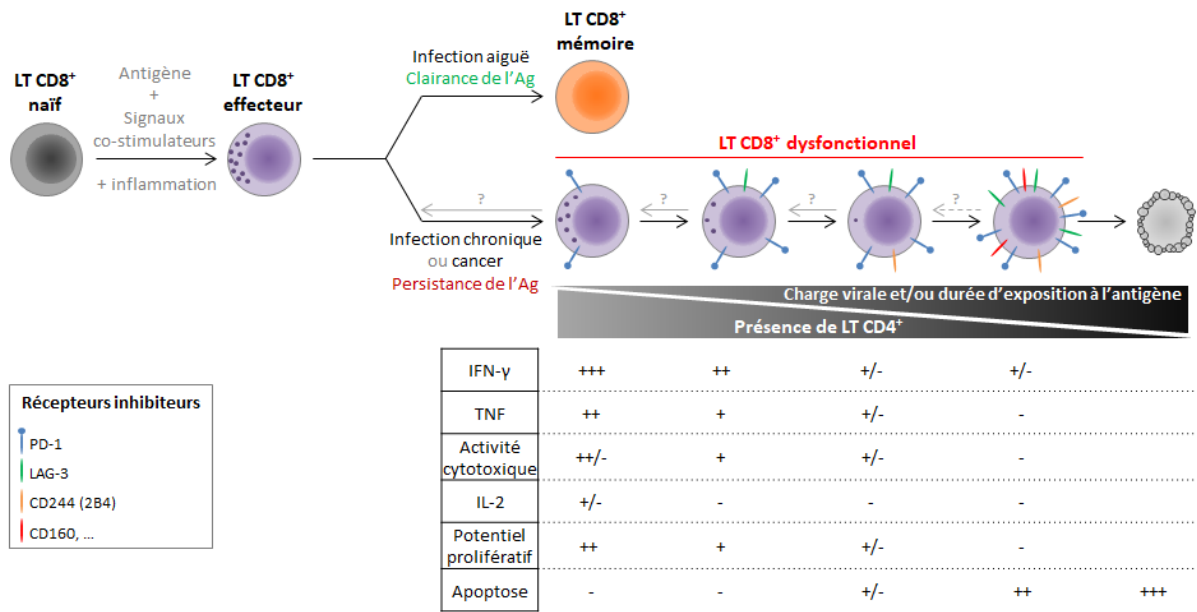


Figure 5 : Caractéristiques moléculaires et phénotypiques des lymphocytes T CD8⁺ dysfonctionnels

III. Restaurer les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ épuisés

Les LT CD8⁺ infiltrant et spécifiques des tumeurs deviennent au cours du temps dysfonctionnels/épuisés. Ceci s'accompagne d'une augmentation progressive de la quantité et de la diversité des iRs ainsi que des aRs. Plusieurs médicaments ciblant ces récepteurs sont actuellement en cours de développement clinique et certains ont reçu l'approbation réglementaire aux États-Unis et en France pour leur utilisation dans divers cancers.

1. Les récepteurs inhibiteurs

Les iRs constituent une famille hétérogène de molécules induites à la surface des LT CD8⁺ activés, qui interviennent dans la régulation négative de ces cellules de diverses façons, allant de la séquestration de ligands co-stimulateurs et de la régulation à la hausse de gènes inhibiteurs à l'utilisation de motifs inhibiteurs tels que les ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif*) et les ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) (Figure 6).

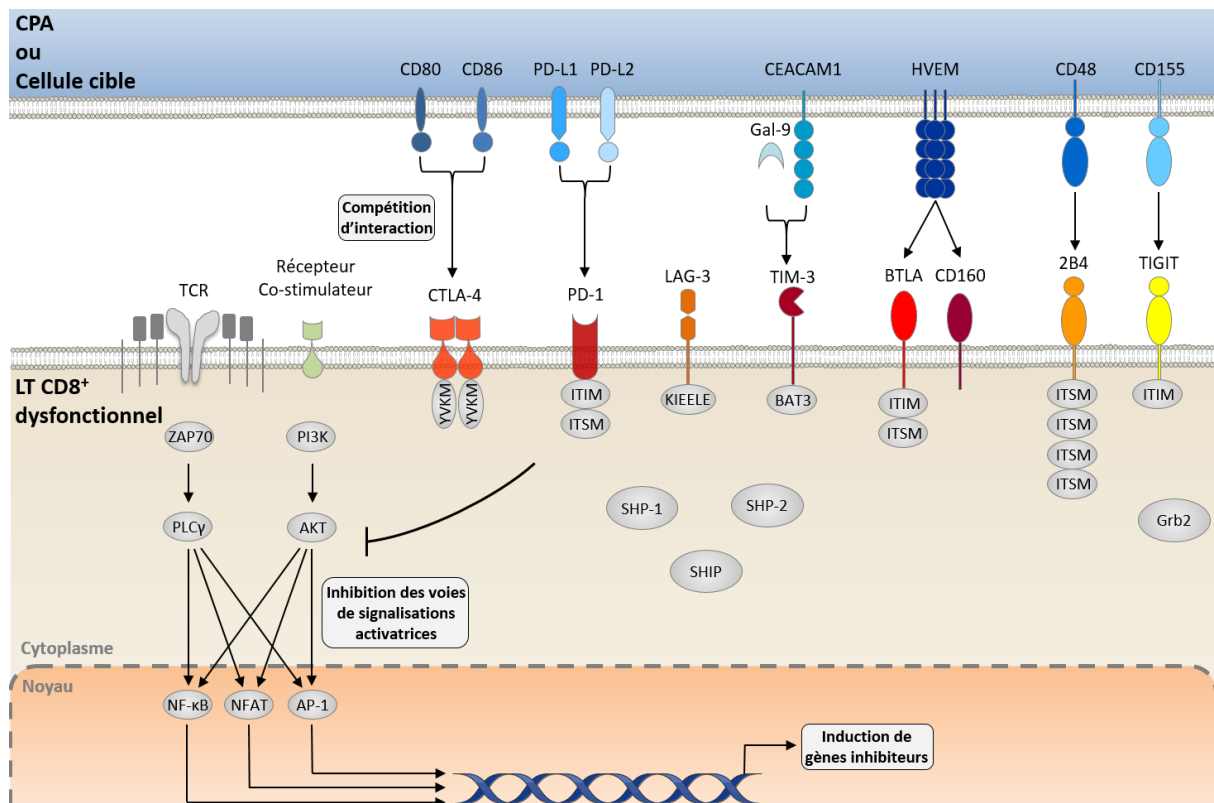


Figure 6 : Les récepteurs inhibiteurs

1.1. PD-1 (programmed cell death 1)

PD-1 (CD279) est un récepteur inhibiteur exprimé sur plusieurs types de cellules immunitaires, telles que les LT activés, les LB, les NK et les MDSC (Vibhakar, Juan et al. 1997; Keir, Butte et al. 2008; Good-Jacobson, Szumilas et al. 2010). Dans la phase effectrice de la réponse immunitaire, l'expression de PD-1 est induite à la surface des LT par l'engagement du TCR et par des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15, l'IL-21 et le VEGF-A (Voron, Colussi et al. 2015). PD-1 a deux ligands connus à ce jour, PD-L1 et PD-L2, qui sont tous les deux exprimés à des niveaux relativement faibles dans les tissus sains. L'expression périphérique de PD-L1 et PD-L2 est considérée comme un médiateur de la tolérance immunitaire naturelle pour éviter des réponses auto-immunes tissulaires et des dommages après une réponse inflammatoire soutenue (Liang, Latchman et al. 2003; Ghiotto, Gauthier et al. 2010). PD-L2 a une affinité plus élevée pour le récepteur PD-1 que PD-L1. Cependant PD-L2 est exprimé à un niveau plus faible par rapport à PD-L1 ; mais en présence de signaux Th2, telles que la présence d'IL-4, l'expression du PD-L2 est régulée à la hausse (Ghiotto, Gauthier et al. 2010). Pourtant le rôle précis de PD-L2 dans l'immunité anticancéreuse, la tolérance et le blocage du récepteur PD-1 n'est pas encore clair.

PD-1 amortit les fonctions des cellules T_{eff} par plusieurs mécanismes (Ishida, Agata et al. 1992; Freeman, Long et al. 2000) (**Figure 7**). Le premier étant l'inhibition directe de la signalisation activatrice induite par le TCR. En effet, suite à la liaison avec PD-L1, PD-1 est phosphorylé sur deux tyrosines présentes dans ses motifs ITIM (Y223) et ITSM (Y248) par les tyrosines kinases Lck et Sck, permettant le recrutement des phosphatases SHP-2 puis SHP-1 (*Src Homology region 2 domain-containing Phosphatases*) (Sheppard, Fitz et al. 2004). Ces deux phosphatases vont alors déphosphoryler les kinases responsables des événements précoces de la signalisation du TCR comme la chaîne ζ du complexe CD3, ZAP70 ou la PKC θ (Okazaki, Maeda et al. 2001; Chemnitz, Parry et al. 2004; Sheppard, Fitz et al. 2004). Cependant, seul le motif ITSM semble être déterminant dans la signalisation intracellulaire de PD-1, puisqu'uniquement les mutations dans ce motif induisent la perte totale de fonction de PD-1 (Chemnitz, Parry et al. 2004; Parry, Chemnitz et al. 2005). De plus, contrairement à SHP-2, il n'est pas encore clair si le recrutement de SHP-1 contribue réellement à la fonction inhibitrice de PD-1 (Yokosuka, Takamatsu et al. 2012). Le deuxième mécanisme est l'inhibition de l'activation de la PI3K, nécessaire à la cascade d'activation de mTOR et d'AKT, par PD-1 (Patsoukis, Brown et al. 2012). PD-1 est ainsi directement impliqué dans la régulation de la survie, de la prolifération mais également de la sensibilité aux besoins en nutriments et du métabolisme lymphocytaire (Patsoukis, Brown et al. 2012; Patsoukis, Li et al. 2013; Patsoukis, Bardhan et al. 2015). Ce récepteur inhibe en effet la glycolyse cellulaire aérobie et la dégradation des acides gras nécessaires à l'acquisition et au maintien des fonctions effectrices des LT CD8⁺ en contrebalançant

l'activation des kinases mTOR (complexes mTORC1 et mTORC2) (Bengsch, Johnson et al. 2016). Le troisième mécanisme est l'inhibition de la voie des MAPK en induisant la déphosphorylation de la PLC γ par SHP-2. PD-1 inhibe ainsi l'activation de la protéine CDK2 (*Cyclin-Dependant Kinase-2*) et dérègle le cycle cellulaire. Pour finir, la signalisation de PD-1 peut induire la surexpression de différents gènes impliqués dans l'épuisement des LT CD8⁺, comme le facteur de transcription BATF. BATF est surexprimé *in vitro* suite à la liaison de PD-1 avec l'un de ses ligands, et sa surexpression induit une altération de la production de cytokines et la prolifération cellulaire (Quigley, Pereyra et al. 2010).

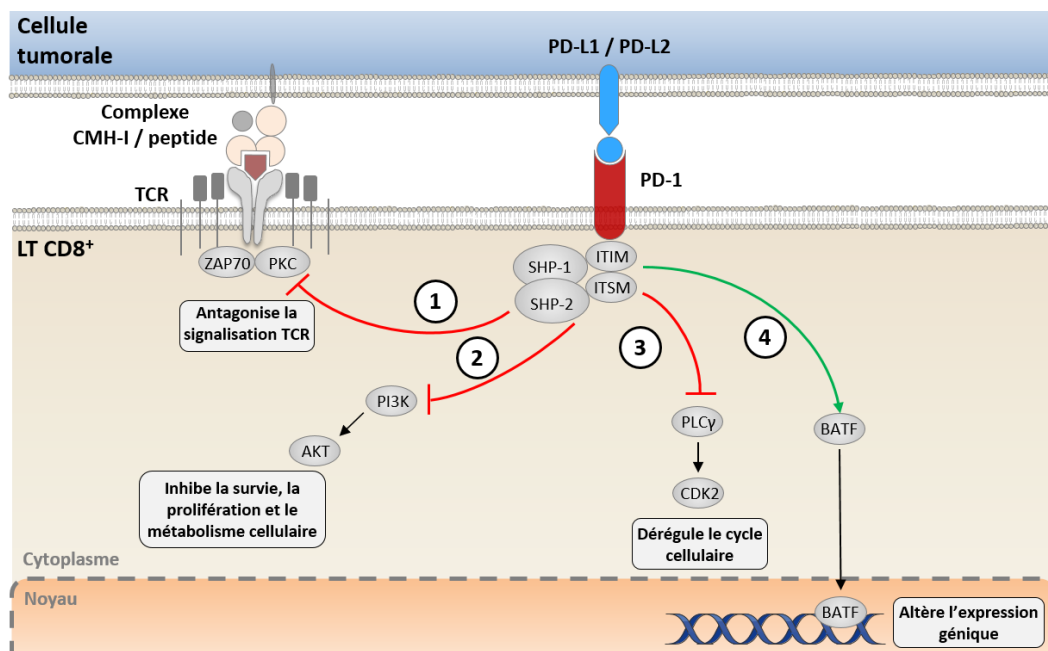


Figure 7 : Mécanismes d'inhibition des fonctions lymphocytaires par la signalisation PD-1/PD-L1

PD-1 inhibe les signaux d'activation du TCR (1), perturbe la survie, la prolifération, le métabolisme cellulaire (2), le cycle cellulaire (3) et l'expression génique (4).

En résumé, PD-1 inhibe particulièrement la production de cytokines par les LT CD8⁺. Plus précisément, PD-1 diminue la sécrétion d'IFN- γ , d'IL-2 ou de TNF- α . Il régule également la prolifération, la survie, l'activité cytotoxique et la différenciation des LT CD8⁺. L'inhibition des fonctions effectrices des LT CD8⁺ dépend de la force d'interaction de PD-1 avec ses ligands. Ainsi, il a été montré que la production de TNF- α et d'IL-2 est très sensible à la signalisation inhibitrice de PD-1. Au contraire, l'inhibition de la production d'IFN- γ et de l'activité cytotoxique nécessite un signal transduit par PD-1 de plus forte intensité (Wei, Zhong et al. 2013).

1.2. CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

CTLA-4 (CD152) s'exprime principalement sur les LT activés, avec une expression cependant dans d'autres cellules immunitaires, telles que les LB et les Treg (Takahashi, Tagami et al. 2000; Quandt, Hoff et al. 2007). Dans la phase initiale de présentation de l'antigène et après l'engagement du complexe TCR-peptide/CMH-I, CTLA-4 est induit à la surface cellulaire et agit comme un récepteur inhibiteur des LT (Allison and Krummel 1995). En effet dans les LT naïfs, CTLA-4 est exprimé à un niveau très faible et il est rapidement régulé à la hausse lors de l'engagement du TCR (Perkins, Wang et al. 1996), par une voie impliquant le facteur de transcription NFATc1 (Gibson, Hedgcock et al. 2007). CTLA-4 est un homologue de CD28, qui est un récepteur co-stimulateur clé des LT CD8⁺. CTLA-4 peut contrebalancer le signal positif exercé par CD28 en rivalisant pour les mêmes ligands (CD80/86) avec une affinité plus élevée (Azuma, Ito et al. 1993; Freeman, Gribben et al. 1993; Hathcock, Laszlo et al. 1993). Après liaison avec ses ligands, CTLA-4 transmet, grâce à son motif YVKM, des signaux négatifs en recrutant les phosphatases PP2A et SHP-2, qui permettent l'inhibition des voies de signalisation de la protéine AKT et du TCR, respectivement (Rudd and Schneider 2003). De plus, CTLA-4 est capable de dégrader directement ses ligands CD80/CD86 par un phénomène de trans-endocytose (Rudd, Taylor et al. 2009; Qureshi, Zheng et al. 2011).

1.3. TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)

TIGIT est un récepteur inhibiteur, largement exprimé dans divers sous-ensembles de cellules T, comprenant les LT auxiliaires folliculaires (Tfh), les Tregs, les LT activés, les cellules NK et NKT (Stanietsky, Simic et al. 2009; Yu, Harden et al. 2009; Godefroy, Zhong et al. 2015). Les ligands de TIGIT sont des molécules d'adhérence cellulaire de type immunoglobuline (Ig) appelées nectines : CD155 (récepteur du poliovirus [PVR]), CD112 (PVRL2) et CD113 (PVRL3, NECTIN-3), ce dernier ayant la plus faible affinité pour son récepteur (Yu, Harden et al. 2009). La liaison de TIGIT à ses ligands entraîne le recrutement de la phosphatase SHIP-1 au niveau de son motif ITIM, grâce à la protéine adaptatrice Grb2, entraînant ainsi l'inhibition des voies de signalisation NF- κ B, PI3K et MAPK (Liu, Zhang et al. 2013). Comme pour les interactions CTLA-4/CD28, TIGIT partage les mêmes ligands que la molécule co-stimulatrice CD226, et entraîne l'inhibition de l'activation des LT en rentrant en compétition pour la liaison aux ligands (Johnston, Comps-Agrar et al. 2014). TIGIT est également capable de prévenir directement l'homodimérisation de CD226 (Johnston, Comps-Agrar et al. 2014), entravant la réponse antitumorale et antivirale des cellules LT CD8⁺ et NK (Tahara-Hanaoka, Shibuya et al. 2006; Welch, Teijaro et al. 2012). Ainsi, une fois activé par ses ligands, TIGIT inhibe l'activité cytotoxique et l'activation des LT, et induit la tolérance en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 par les DC.

1.4. LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*)

LAG-3 (CD223) est exprimé sur diverses cellules immunitaires telles que les LB, les cellules NK, les LT activés et les Tregs (Baixeras, Huard et al. 1992; Huang, Workman et al. 2004; Kisielow, Kisielow et al. 2005; Workman, Wang et al. 2009). Dans le cas des LT, LAG-3 est exprimé de façon transitoire à la surface cellulaire lors de l'activation, et il est ensuite internalisé et dégradé dans les compartiments lysosomaux (Bae, Lee et al. 2014). LAG-3 présente des homologies structurales avec la molécule CD4, et se lie au CMH-II avec une affinité plus élevée (Triebel, Jitsukawa et al. 1990; Huard, Prigent et al. 1995). LAG-3 interagit aussi avec la LSECTin, une lectine de surface de la famille DC-SIGN qui est exprimée sur les DC et aussi dans les tissus tumoraux (Xu, Liu et al. 2014). À la surface des LT CD4⁺, LAG-3 interagit avec le CMH-II et inhibe la signalisation en aval de CD4 via son motif cytoplasmique KIEELE, cependant LAG-3 ne perturbe pas l'engagement CD4/CMH-II (Workman, Dugger et al. 2002). LAG-3 interagit également avec les complexes TCR/CD3 à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺, inhibant ainsi la réponse calcique engendrée par la stimulation du TCR (Hannier, Tournier et al. 1998). En résumé, LAG-3 présente un impact négatif sur l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices des LT (inhibition de la production d'IFN- γ) (Workman, Cauley et al. 2004; Macon-Lemaitre and Triebel 2005).

1.5. TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-containing protein 3*)

TIM-3 (CD366) est exprimé sur différents sous-ensembles de cellules T dont les CD4⁺ Th1 et CD8⁺ activés, les Tregs mais aussi sur les DCs, macrophages et monocytes (Monney, Sabatos et al. 2002; Anderson, Lord et al. 2010). TIM-3 possède différents ligands, tels que la galectine-9 (Gal-9) (Zhu, Anderson et al. 2005), la phosphatidylsérine (Freeman, Casasnovas et al. 2010), CEACAM1 (*Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 1*) (Huang, Zhu et al. 2015), et HMGB1 (*High Mobility Group Protein 1*) (Chiba, Baghdadi et al. 2012). Lors de l'interaction avec la Gal-9, TIM-3 présente des fonctions suppressives mais ne contient pas pour autant de motif ITIM dans son domaine intracellulaire. La fonction inhibitrice de TIM-3 est opérée grâce au recrutement en aval de la protéine-tyrosine kinase Fyn et de l'adaptateur de la PI3K, p85 (Asakura, Kashio et al. 2002; Lee, Su et al. 2011). TIM-3 induit alors la tolérance et l'épuisement des LT CD8⁺, conduisant même à l'apoptose de ces cellules (Zhu, Anderson et al. 2005; Sehrawat, Reddy et al. 2010).

1.6. 2B4

2B4 (CD244) est exprimé par les cellules NK, les LT $\gamma\delta$, les basophiles, les monocytes, et les LT CD8⁺ activés. 2B4 a une forte affinité pour son ligand CD48 (Garni-Wagner, Purohit et al. 1993; Brown, Boles et al. 1998; Nakajima, Cella et al. 1999). Un autre partenaire de CD48 est CD2, qui fournit des signaux co-stimulateurs (Muhammad, Schiller et al. 2009). Comme dans le cas de TIGIT,

l'interaction 2B4/CD48 engendre soit une signalisation intracellulaire directe par le recrutement des phosphatases SHP-1, SHP-2 et SHIP par ses motifs ITSM, soit une perturbation de l'engagement CD2/CD48. Il est intéressant de noter que 2B4 n'est pas un simple récepteur inhibiteur, mais il peut aussi exercer des fonctions co-stimulatrices. Par exemple, le niveau d'expression de 2B4, la présence de protéine adaptatrice en aval, telles que SAP ou EAT-2, et la phosphorylation ou non des quatre motifs ITSM régulent la fonction inhibitrice ou activatrice de ce récepteur (Bloch-Queyrat, Fondaneche et al. 2005; Eissmann, Beauchamp et al. 2005; Chlewicki, Velikovskiy et al. 2008).

1.7. BTLA (B and T lymphocyte attenuator)

BTLA partage des similitudes structurelles avec les récepteurs PD-1 et CTLA-4. Il est exprimé à la surface des LT, LB, macrophages et des DC (Watanabe, Gavrieli et al. 2003; Han, Goularte et al. 2004). Tout comme LAG-3, BTLA est transitoirement régulé positivement lors de l'engagement du TCR, et négativement sur les LT totalement activés (Watanabe, Gavrieli et al. 2003). La molécule HVEM (*Herpesvirus entry mediator*), qui s'exprime sur différents types de cellules (DC, NK, LT et LB) interagit avec BTLA ainsi qu'avec l'IR CD160 et l'aR LIGHT (Sedy, Gavrieli et al. 2005; Cai, Anumanthan et al. 2008). L'interaction de BTLA/HVEM conduit à la phosphorylation du motif ITIM de BTLA, induisant le recrutement des phosphatases SHP-1/SHP-2, entraînant ainsi une diminution de la sécrétion d'IL-2 et de la prolifération des LT (Watanabe, Gavrieli et al. 2003; Gonzalez, Loyet et al. 2005).

1.8. Identification de nouveaux récepteurs

L'étude du statut d'épuisement des LT CD8⁺ dans l'infection par le LCMV ou dans des modèles tumoraux murins, a permis d'obtenir de nombreuses informations au niveau transcriptionnel en les comparant à des populations de cellules T naïves, T_{eff} ou T mémoires (Wherry, Ha et al. 2007; Schietinger, Philip et al. 2016). De nouveaux acteurs contribuant à l'épuisement des LT CD8⁺, ainsi que de nouveaux récepteurs jouant un rôle dans ce phénomène pourront alors être identifiés à partir de ces données. Par exemple dans ces différentes études, il a été montré que la neuropiline-1 (Nrp-1) est l'un des gènes les plus régulés positivement dans les LT CD8⁺ épuisés/dysfonctionnels (Wherry, Ha et al. 2007; Schietinger, Philip et al. 2016). Ce récepteur semble donc être un bon candidat pour contribuer à l'épuisement des LT CD8⁺. Dans la partie IV, la structure, l'expression ainsi que le rôle de la Nrp-1 dans le système immunitaire en particulier seront abordés.

2. Les récepteurs co-stimulateurs

Les récepteurs co-stimulateurs (aRs) sont induits à la surface des LT activés et interviennent dans la régulation positive de ces cellules, souvent par le recrutement de molécules adaptatrices (TRAF) qui permettent l'activation des voies de survie et de prolifération (**Figure 8**).

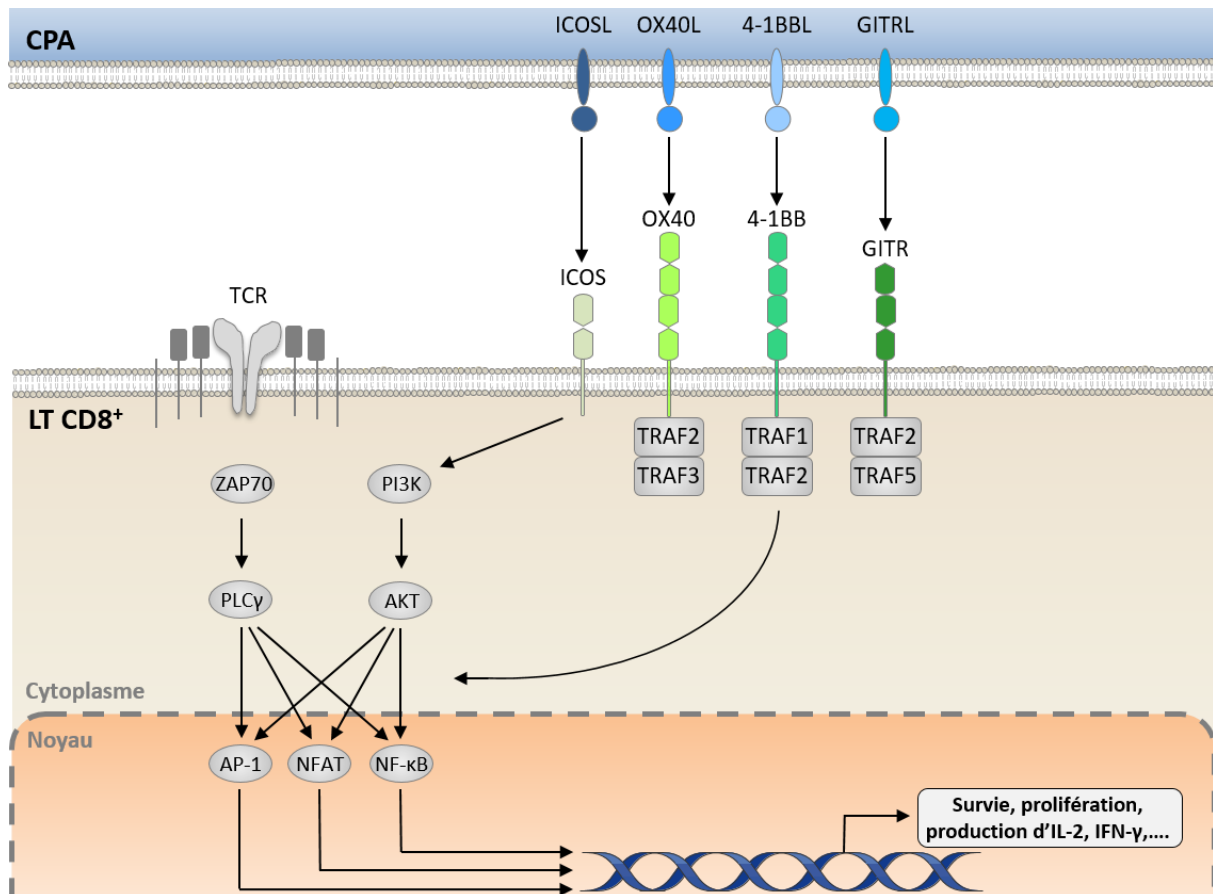


Figure 8 : Les récepteurs co-stimulateurs

2.1. GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*)

GITR (CD357/TNFRSF18) est un membre de la superfamille des TNFR (TNFRSF). Ce récepteur est exprimé de façon constitutive sur les cellules Tregs, et il est régulé positivement sur les LT CD4⁺ et CD8⁺ 24 heures après leur activation, puis maintenu pendant plusieurs jours (Ronchetti, Zollo et al. 2004). GITR semble avoir un rôle critique dans le soutien de l'activité des T_{eff} en induisant la prolifération et les fonctions effectrices de ces cellules, ainsi qu'en soutenant leur survie. Après interaction avec son ligand GITRL, la signalisation en aval de GITR est exercée grâce aux protéines adaptatrices TRAF-5 et TRAF-2, conduisant à l'activation des voies de signalisation de NF-κB et de la MAPK, augmentant ainsi l'expression de l'IL-2R α , l'IL-2 et l'IFN- γ (Ronchetti, Zollo et al. 2004; Snell, Lin et al. 2011). GITR protège aussi les LT de la mort cellulaire induite par activation (AICD), entraînant ainsi une augmentation du nombre de LT mémoires. Par conséquent, la signalisation induite par GITR peut améliorer les réponses immunitaires de l'hôte et faciliter le rejet de la tumeur (Shimizu, Yamazaki et al. 2002). Les anticorps agonistes de GITR en combinaison ou non avec le blocage de PD-1 se sont avérés efficaces pour ralentir la croissance tumorales dans des modèles murins (Lu, Xu et al. 2014).

2.2. OX40

OX40 (CD134/TNFRSF4) est membre de la TNFRSF, qui est exprimé à la surface de divers sous-ensembles de cellules T ; NK, LT CD4⁺ et CD8⁺ (Cannons, Lau et al. 2001; Bansal-Pakala, Halteman et al. 2004). OX40 n'est pas exprimé par les LT au repos ou non activés, mais il est induit de façon transitoire après l'engagement du TCR, apparaissant généralement après 12 heures (Croft 2010). La liaison du récepteur OX40 à son ligand OX40L induit la prolifération et l'activation des T_{eff} (Redmond, Ruby et al. 2009) grâce au recrutement des molécules adaptatrices TRAF-2 et TRAF-3 qui permettent l'activation des voies de signalisation canoniques et non canoniques de NF-κB (Rogers, Song et al. 2001; Song, So et al. 2005). Les anticorps agonistes d'OX40 favorisent la réponse des LT effecteurs, déplètent la population de Tregs et induisent une régression tumorale (Redmond, Ruby et al. 2009; Bulliard, Jolicoeur et al. 2014).

2.3.4-1BB

Comme les autres aRs, 4-1BB (CD137) est également un membre de la TNFRSF. 4-1BB est un récepteur exprimé par les LT activés, les Tregs et les cellules NK. Il est également présent sur les neutrophiles et les cellules de la lignée myéloïde, comprenant certaines sous-populations de DC (Melero, Johnston et al. 1998; Lai, August et al. 2015). Ainsi, 4-1BB est exprimé rapidement après activation des LT, et son expression se poursuit pendant 48 heures. L'interaction de 4-1BB avec son ligand (4-1BBL) provoque l'activation et la survie des LT et NK, et améliore leurs fonctions effectrices. Cela est assuré par le recrutement des molécules adaptatrices TRAF-1 et TRAF-2, permettant l'activation des voies de signalisation du facteur de transcription NF-κB et de la MAPK (Saoulli, Lee et al. 1998; Sabbagh, Pulle et al. 2008; Martinez-Forero, Azpilikueta et al. 2013). Des anticorps agonistes de 4-1BB ont des effets positifs sur la prolifération et la survie des LT CD8⁺, et permettent la diminution de la masse tumorale dans plusieurs modèles murins (Bartkowiak and Curran 2015; Chen, Lee et al. 2015).

2.4. ICOS (*Inducible T cell costimulator*)

ICOS (CD278) est exprimé sur les LT activés et sert de médiateur pour l'activation, la survie, la prolifération et les fonctions effectrices de ces cellules, mais ne permet pas d'induire la production d'IL-2 (Dong, Juedes et al. 2001; van Berkel and Oosterwegel 2006). ICOS est activé par son ligand ICOSL, qui est exprimé généralement sur les LB et les CPA (Sharpe 2009). L'activation d'ICOS permet le recrutement et l'activation de la PI3K, via ses sous-unités p85 et p50α, engendrant l'activation des voies de signalisation d'AKT et c-MAF (Chen and Flies 2013). ICOS est un marqueur des cellules T immunocompétentes dans les tumeurs (Capece, Verzella et al. 2012). Son activation par un anticorps

agoniste a des effets synergiques avec le blocage de CTLA-4 dans les modèles précliniques de mélanome et de cancer du pancréas (Fan, Quezada et al. 2014).

3. Immunothérapies anticancéreuses

L'immunothérapie a révolutionné le traitement du cancer ces dernières années. Alors que la chimiothérapie, la radiothérapie, et les thérapies ciblées cherchent à détruire, de façon directe, les cellules tumorales, l'immunothérapie quant à elle, aide le système immunitaire à reconnaître et à éliminer les cellules cancéreuses. Ainsi le développement d'anticorps monoclonaux ciblant les iRs et de stratégies vaccinales ainsi que l'utilisation de *CAR T cells* (cellules T génétiquement modifiées pour exprimer un TCR chimérique) sont en train de bouleverser le traitement des patients atteints de cancers (Sanmamed and Chen 2018). En particulier, les stratégies pour lever les freins des LT CD8⁺ dysfonctionnels ont pris une place privilégiée dans le traitement du cancer et ont permis d'obtenir des réponses aux traitements impressionnantes. En effet, les LT CD8⁺ dysfonctionnels ne sont pas inertes, ils conservent des fonctions sous-optimales mais cruciales qui limitent la progression tumorale. La démonstration que l'épuisement des LT CD8⁺ est réversible constitue une possibilité considérable de recourir à l'immunothérapie pour améliorer l'immunité des patients (Schietinger and Greenberg 2014). Ainsi un large panel d'anticorps ciblant les iRs ou les aRs a été développé au cours des dernières années pour revigorer la réponse anti-tumorale exercée par les LT CD8⁺ (**Figure 9**).

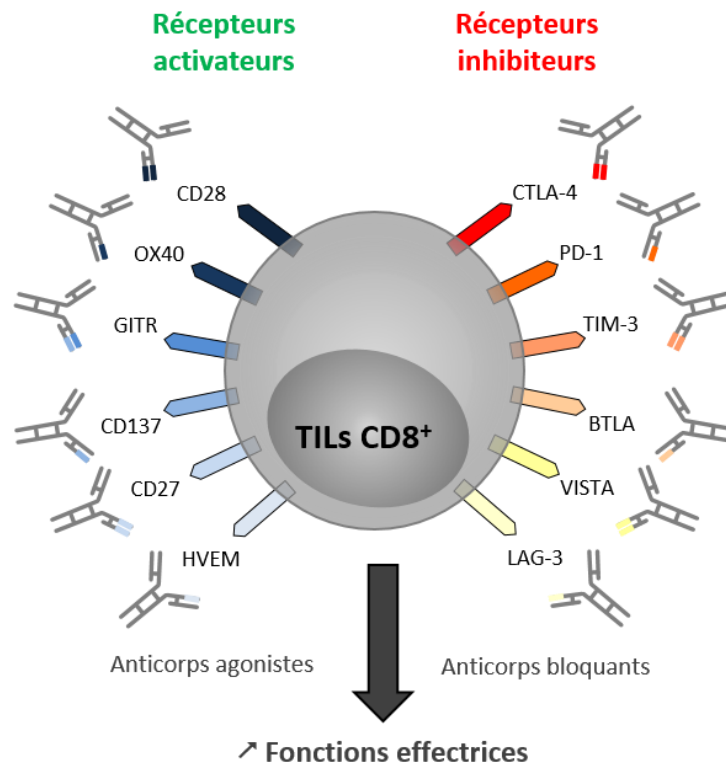


Figure 9 : Cibles des immunothérapies utilisant des anticorps

En plus de la reconnaissance spécifique de l'antigène par le TCR, l'activation des LT CD8⁺ est régulée par un équilibre de signaux positifs et négatifs fournis par les récepteurs activateurs et inhibiteurs. Les anticorps agonistes dirigés contre les molécules activatrices et les anticorps bloquants contre les récepteurs inhibiteurs peuvent améliorer l'activation des LT CD8⁺ pour favoriser la destruction des tumeurs.

3.1. Immunothérapie : anticorps monoclonaux agonistes et antagonistes

Pour restaurer les fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺, beaucoup d'études ont ciblé les voies de signalisation associées à l'épuisement lymphocytaire permettant ainsi d'améliorer les fonctions effectrices des LT CD8⁺. Ainsi, le ciblage des iRs et des aRs peut inverser cet état dysfonctionnel et rétablir les réponses immunitaires (Peggs, Quezada et al. 2009). Par conséquent, l'immunothérapie anticancéreuse utilisant des anticorps antagonistes (bloquants) a révolutionné le traitement et les perspectives de survie des patients atteints de cancer. En particulier, l'approbation aux Etats-Unis en 2011 de l'ipilimumab, un anticorps bloquant anti-CTLA-4, suivie de celle du nivolumab et du pembrolizumab, anticorps bloquant anti-PD-1, a ouvert la voie à leur utilisation comme agents immunothérapeutiques (Hodi, O'Day et al. 2010; Robert, Schadendorf et al. 2013; Topalian, Sznol et al. 2014). Cependant, les patients traités avec un anticorps bloquant anti-PD-1, ont des toxicités immunitaires similaires à celles observées avec l'anticorps bloquant anti-CTLA-4 mais avec une fréquence généralement plus faible (Larkin, Chiarion-Sileni et al. 2015). De ce fait, les anticorps bloquant anti-PD-1 étant mieux tolérés par la majorité des patients, ont pris une place privilégiée dans le traitement du cancer. Les dernières données cliniques indiquent que l'inhibition de PD-1 est efficace chez environ 20 à 30 % des patients atteints de différents cancers, comprenant le mélanome,

le cancer du poumon, le cancer de la tête et du cou, le cancer du rein, ... (Topalian, Hodi et al. 2012). En parallèle, un véritable engouement s'est créé pour développer de nouveaux anticorps pour le traitement du cancer. En effet, compte tenu de l'hétérogénéité de l'expression des iRs, mais aussi des aRs par les LT CD8⁺ dysfonctionnels, le développement d'anticorps bloquants contre divers iRs, mais aussi d'anticorps agonistes pour les aRs sont en cours d'essais clinique, pour évaluer leur potentiel thérapeutique dans différents types de cancers (**Tableau 1**).

Les traitements ciblant PD-1 sont très actifs dans de nombreux types de cancer, mais de nouvelles données indiquent que les avantages thérapeutiques se limitent à un sous-ensemble de patients dans chaque entité cancéreuse. La présence de LT CD8⁺ dans le microenvironnement tumoral ou la marge invasive de la tumeur (Tumeh, Harview et al. 2014), qui peut être maintenant déterminée à partir d'image de scanner (Sun, Limkin et al. 2018), ainsi que la régulation à la hausse de PD-L1 (Patel and Kurzrock 2015), se sont révélées être les biomarqueurs les plus prédictifs du bénéfice clinique en réponse à l'inhibition de PD-1. Cependant, certains patients atteints de mélanome ayant un statut PD-L1 négatif répondent au traitement par pembrolizumab, et inversement des patients avec un statut positif pour PD-L1 ne répondent pas au traitement d'anti-PD-1 (Teixido, Gonzalez-Cao et al. 2015). De plus, la détection de PD-L1 n'est pas encore standardisée étant donné que chaque compagnie (BRISTOL-MYERS SQUIBB, Merck,...) a développé ses propres méthodes d'immunohistochimies (Yi, Jiao et al. 2018). Comme difficulté supplémentaire, l'expression de PD-L1 peut varier à l'intérieur de la tumeur et peut être induite par des thérapies antérieures (Topalian, Hodi et al. 2012). L'expression de PD-L1 est importante mais doit être prise en compte avec précaution. Cependant, une étude récente a montré une expression de PD-L1 sur des exosomes présents dans le sang de patients atteints de mélanome. L'ampleur de l'augmentation de PD-L1 sur les exosomes circulants au cours des premiers stades de traitement à l'anti-PD-1, permettrait de prédire les patients répondeurs à ce traitement et pourrait ainsi devenir un marqueur de réponse par cette méthode de détection (Chen, Huang et al. 2018). En parallèle, l'augmentation de LT CD8⁺ PD-1⁺ dans le sang périphérique après 4 semaines de traitement aux anticorps anti-PD-1 est en corrélation avec le bénéfice clinique chez les patients atteints d'un cancer du poumon (Kamphorst, Pillai et al. 2017), ainsi que la présence de LT CD8⁺ PD-1^{high} au sein de la tumeur pulmonaire (Thommen, Koelzer et al. 2018). Les tumeurs ayant une charge mutationnelle élevée et exprimant par conséquent des antigènes puissants dérivés *de novo*, les néo-antigènes, réagissent mieux au blocage des iRs (PD-1 et CTLA-4). A l'inverse les tumeurs peu immunogènes répondent peu à ces immunothérapies (Le, Uram et al. 2015; Rizvi, Hellmann et al. 2015; Van Allen, Miao et al. 2015). Pour finir, la composition de la flore intestinale semble prédire l'efficacité et la toxicité de l'immunothérapie chez les patients

souffrant de mélanome ou de cancer du poumon (Gopalakrishnan, Helmink et al. 2018; Matson, Fessler et al. 2018; Routy, Le Chatelier et al. 2018).

Tableau 1 : Liste des anticorps ciblant des récepteurs inhibiteurs et co-stimulateurs actuellement en développement clinique et préclinique

Liste des immunothérapies utilisant des anticorps monoclonaux visant à restaurer les fonctions effectrices des LT CD8⁺, basée sur les données issues des sites internet « *clinicaltrials.gov* » et de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Abréviations : LT, lymphocyte T ; Treg, lymphocyte T régulateurs ; LB, lymphocyte B ; DC, cellule dendritique ; NK, lymphocyte *Natural Killer* ; MØ, macrophage ; AMM, autorisation de mise sur le marché.

	Récepteur cible	Expression	Ligand(s) Connu(s)	Médicament(s)	Stade développement clinique	Tumeur(s)
Récepteurs inhibiteurs	CTLA-4	LT CD8 ⁺ activés Treg LB	CD80 CD86	Ipilimumab Tremelimumab	AMM Phase 3	Mélanome Tumeurs solides multiples
	PD-1	LT CD8 ⁺ activés Treg DC LB NK MØ	PD-L1 PD-L2	<u>Anti-PD-1</u> : Nivolumab Pembrolizumab Pidilizumab <u>Anti-PD-L1</u> : Avelumab Atezolizumab Durvalumab	AMM AMM Phase 2 AMM AMM Phase 3	Tumeurs solides multiples
	Tim-3	LT LB DC NK MØ	Galectine-9	MBG453 Sym023 TSR-022	Phase 1/2 Phase 1 Phase 1	Tumeurs solides multiples
	LAG-3	LT LB NK	CMH-II	LAG525 BMS-986016 Sym022	Phase 1/2 Phase 1/2 Phase 1	Tumeurs solides multiples Hémopathies malignes
	TIGIT	LT NK	CD155 CD112 CD113	OMP-313M32 AB154	Phase 1 Phase 1	Tumeurs solides multiples
	BTLA	LT activés DC MØ NK LB	HVEM		Stade préclinique (Lasaro, Sazanovich et al. 2011; Hobo, Norde et al. 2012)	
Récepteurs activateurs	4-1BB	LT activés DC NK LB	4-1BBL	Urelumab PF-05082566 BMS-663513	Phase 1/2 Phase 1/2 Phase 1/2	Tumeurs solides multiples Hémopathies malignes
	OX40	LT activés Treg NK Neutrophile	OX40L	MEDI6469 PF-04518600	Phase 1/2 Phase 1/2	Tumeurs solides multiples
	GITR	LT activés Treg	GITRL	TRX518	Phase 1	Tumeurs solides multiples
	ICOS	LT activés	ICOSL	GSK3359609 MEDI-570 JTX-2011	Phase 1 Phase 1 Phase 1/2	Tumeurs solides multiples Hémopathies malignes

3.2. Combinaisons

3.2.1. Combinaison entre les anticorps

La raison pour bloquer plusieurs iRs simultanément est forte et rationnelle, car bien que tous les iRs soient exprimés sur les LT CD8⁺, ces récepteurs ont des mécanismes différents pour inhiber la fonction de ces cellules. Le blocage simultané de multiples iRs, par des anticorps monoclonaux (Acm) principalement, permet ainsi d'améliorer la réponse aux traitements, et obtenir une meilleure réponse immunitaire. Ce concept a été démontré dans de nombreux modèles précliniques. Par exemple, pour PD-1 et LAG-3 (Blackburn, Shin et al. 2009) dans l'infection chronique par le LCMV, et pour PD-1 et CTLA-4 dans l'infection par le VIH, ainsi que dans d'autres types d'infections et le cancer (Kaufmann, Kavanagh et al. 2007; Matsuzaki, Gnjatic et al. 2010). De nombreuses autres combinaisons d'iRs tels que PD-1 et TIM-3 (Fourcade, Sun et al. 2010; Sakuishi, Apetoh et al. 2010) peuvent également améliorer les fonctions effectrices des LT CD8⁺ dysfonctionnels, et le blocage combiné de PD-L1 et de TIGIT a permis de rétablir l'immunité antitumorale mieux que le blocage de PD-L1 seul (Johnston, Comps-Agrar et al. 2014). Le blocage simultané de PD-1 et CTLA-4 chez les patients atteints de mélanome a démontré un contrôle tumoral impressionnant. En effet, cette association a fait passer à 57 % la population de patients répondants à ce traitement (Wolchok, Kluger et al. 2013). Cette amélioration de la réponse est provoquée du fait que les réponses immunitaires déclenchées par le blocage des iRs CTLA-4 et PD-1 sont induites par des mécanismes cellulaires distincts (Wei, Levine et al. 2017). En effet, l'anticorps anti-PD-1 induit principalement l'expansion des LT CD8⁺ infiltrant et spécifiques de la tumeur. En revanche, l'anticorps anti-CTLA-4 induit l'expansion d'une population d'effecteurs CD4⁺ de type ICOS⁺ Th1, en plus du sous-ensemble de cellules T CD8⁺ spécifiques de la tumeur. Dans des modèles murins, les anticorps anti-CTLA-4 favorisent aussi la déplétion des cellules Tregs dans le microenvironnement tumoral. Cet effet semble être assuré par des cellules innées présentes au sein de la tumeur exprimant des niveaux élevés de récepteur FcγRIV (Simpson, Li et al. 2013; Arce Vargas, Furness et al. 2018). Cependant des effets secondaires plus importants avec cette combinaison ont été observés. Par conséquent, plusieurs essais cliniques sont en cours pour ajuster les doses d'anticorps anti-CTLA-4 ayant pour but de diminuer ces effets néfastes. En parallèle, des essais cliniques portant sur d'autres combinaisons d'anticorps bloquant les iRs sont en cours d'évaluation pour essayer de déterminer l'association la plus efficace pour différents types de cancers. Comme par exemple, l'association d'anticorps anti-PD-1 et anti-LAG-3 (NCT01968109), anti-PD-1 et anti-TIGIT (NCT03628677, NCT03119428), ou encore anti-PD-1 et anti-TIM-3 (NCT02817633, NCT02608268).

Le rôle bénéfique de la combinaison d'anticorps agonistes contre les voies de co-stimulation avec le blocage des voies inhibitrices a été démontré dans des modèles précliniques. Par exemple, la combinaison de l'Acm anti-PD-1 avec un anticorps agoniste contre 4-1BB améliore considérablement la fonction des LT CD8⁺ dysfonctionnels et le contrôle viral (Vezys, Penaloza-MacMaster et al. 2011). La combinaison de l'anticorps bloquant anti-CTLA-4 avec l'anticorps agoniste anti-4-1BB, ou celle utilisant l'anticorps bloquant anti-LAG-3 avec l'anticorps agoniste anti-4-1BB, ont permis un ralentissement spectaculaire de la croissance tumorale (Kocak, Lute et al. 2006; Williams, Horton et al. 2017). Ces associations doivent être poursuivies pour déterminer les meilleures combinaisons possibles. De plus, plusieurs essais de combinaisons d'anticorps agonistes avec des anticorps antagonistes sont en cours chez l'homme pour différents types de cancer, telles que l'association anti-GITR avec l'anti-PD-1 (NCT02740270), anti-4-1BB avec anti-PD-1 (NCT02652455, NCT02179918), ou encore anti-ICOS avec anti-PD-1 ou anti-CTLA-4 (NCT02904226).

3.2.2. Combinaison avec la chimiothérapie

La combinaison de la chimiothérapie avec l'immunothérapie semble prometteuse car elle permettrait la réduction de la charge tumorale ; la potentialisation de la réponse immunitaire antitumorale en augmentant le taux de néoantigènes par nécrose de la tumeur ; et d'affecter directement les cellules stromales de la tumeur. Le choix de l'agent chimiothérapeutique et de la cinétique de ces combinaisons seront importants, en effet de nombreuses chimiothérapies cytotoxiques existent et ciblent les cellules à division rapide. Cependant, ces traitements peuvent inhiber les LT en expansion et nuire ainsi à l'efficacité des Acm anti-CTLA-4 et anti-PD-1.

Les agents chimiothérapeutiques qui ciblent les histones désacétylases sont capables d'agir en synergie avec les anticorps bloquants anti-CTLA-4 ou anti-PD-1 pour éradiquer les tumeurs primaires et les métastases qui sont faiblement immunogènes dans les modèles murins (Kim, Skora et al. 2014). L'association de l'anti-PD-1 avec de la chimiothérapie à base de platine (par exemple, gemcitabine-cisplatine, pemetrexed-cisplatine et paclitaxel-carboplatine) dans un essai clinique de phase I chez des patients atteints de cancers bronchique non à petites cellules (CBNPC) a montré des taux de réponse globalement satisfaisant (Rizvi, Hellmann et al. 2016). Cependant, en raison d'importants effets indésirables, l'arrêt du traitement a été effectué chez 20 % des patients. Un suivi plus long est nécessaire pour déterminer si les réponses de ces premiers essais combinés dans le CBNPC sont plus durables que la chimiothérapie standard.

3.2.3. Combinaison avec la radiothérapie

La radiothérapie a le potentiel de transformer des tumeurs « froides » (peu immunogènes) en tumeurs « chaudes » (fortement immunogènes) par une combinaison de mécanismes distincts. Notamment, par l'augmentation de l'immunogénicité tumorale en régulant à la hausse l'expression d'antigènes, des CMH et des signaux co-stimulateurs ; par changement du microenvironnement tumoral immunosuppresseur en un environnement plus favorable (augmentation de la production de cytokines immunostimulatrices par exemple) ; et par le recrutement de CPA et de cellules effectrices immunitaires au sein du microenvironnement tumoral. Dans de multiples études précliniques, il a été démontré que la radiothérapie génère des réponses immunitaires spécifiques aux tumeurs, et que les LT CD8⁺ sont un composant clé pour la réponse à ce traitement (Lugade, Moran et al. 2005; Lee, Auh et al. 2009). De plus, la combinaison de la radiothérapie avec de l'immunothérapie utilisant des anticorps bloquants anti-CTLA-4 ou anti-PD-1 permet une réponse antitumorale accrue en comparaison aux monothérapies (Demaria, Kawashima et al. 2005; Dewan, Galloway et al. 2009; Kroon, Gadiot et al. 2016). D'un point de vue clinique, il existe des preuves formelles qu'une combinaison de la radiothérapie avec de l'immunothérapie ciblée conduit à une amélioration des réponses antitumorales (Ko and Formenti 2018).

3.2.4. Combinaison avec les traitements ciblant le microenvironnement tumoral

L'enzyme cytosolique IDO1 est l'enzyme permettant la dégradation du tryptophane. Dans le microenvironnement tumoral, l'IDO1 est produit par les cellules tumorales, les MDSC et les macrophages tumoraux en réponse à des signaux inflammatoires tels que l'IFN- γ . Des niveaux élevés d'IDO1 réduisent les niveaux de tryptophane et créent des métabolites bioactifs du tryptophane, tous deux supprimant l'activité des LT (Munn 2012). Un inhibiteur de l'IDO1 (Epcadostat) est actuellement en essais clinique en combinaison ou non avec de l'immunothérapie pour différents types de cancers. L'association avec les Acm anti-CTLA-4 et anti-PD-1 a permis à de nombreux patients de développer une réponse objective, et de maintenir la stabilité de la maladie (Mitchell, Hamid et al. 2018).

L'augmentation de l'expression du TGF- β est fortement associée à la progression tumorale dans divers types tumoraux (Derynck, Akhurst et al. 2001). Le médicament ciblant le TGF- β le plus avancé en développement clinique est le LY2157299 (galunisertib), un inhibiteur de kinases inhibant sélectivement la signalisation du récepteur au TGF- β . Dans des modèles précliniques, le galunisertib a montré une activité synergique avec le traitement anti-PD-L1 pour la croissance tumorale

(Holmgaard, Schaer et al. 2018). Des essais cliniques du galunisertib en association avec le nivolumab sont en cours dans des tumeurs solides avancées (NCT02423343).

L'adénosine extracellulaire peut être détectée par des récepteurs qui régulent les fonctions immunitaires, comme le récepteur d'adénosine A2A (ADORA2A). ADORA2A est exprimé sur les LT CD8⁺, les NK et les MDSC, et participe à l'arrêt des réponses immunitaires dans un contexte inflammatoire (Pardoll 2012). Le déficit en ADORA2A ou le blocage pharmacologique diminue l'immunosuppression des LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs dans de multiples modèles précliniques (Cekic and Linden 2014). Bien que le ciblage direct d'ADORA2A soit une approche pour moduler cette voie, la complexité de ce récepteur, qui est exprimé par des composantes du système nerveux central et périphérique, a encouragé le développement de stratégies alternatives (Yuan and Jones 2014). L'adénosine extracellulaire peut être produite par les ectonucléotidases CD39 (ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase 1), qui convertit l'ATP en ADP et l'ADP en AMP, et CD73 (également connu sous le nom de 5'-nucleotidase), qui convertit l'AMP en adénosine (Yegutkin 2008). Les deux ectonucléotidases peuvent être régulées à la hausse sur les cellules tumorales ainsi que sur les cellules Treg présentes dans le microenvironnement tumoral (Mandapathil, Hilldorfer et al. 2010). Un anticorps spécifique de CD73 a montré une activité synergique lorsqu'il était combiné avec des anticorps anti-CTLA-4 ou anti-PD-1 dans plusieurs modèles de tumeurs chez la souris (Allard, Pommey et al. 2013). Un essai clinique avec un anticorps anti-CD73 en combinaison avec le pembrolizumab est en cours dans diverses tumeurs solides (NCT03454451).

3.3. Résistances

La compréhension des mécanismes moléculaires qui entraînent une insensibilité à l'immunothérapie est à entreprendre dans les années à venir, tant pour les résistances primaires que secondaires.

Les patients qui présentent une résistance primaire aux immunothérapies utilisant des anticorps bloquants ne répondent pas au traitement initial. Les études en cours indiquent que les facteurs intrinsèques et extrinsèques aux cellules tumorales contribuent aux mécanismes de résistance (absence d'antigènes forts, défaut de présentation d'antigènes, absence de LT CD8⁺ à la tumeur, ou forte présence de cellules immunitaires immunosuppressives). Les raisons les plus simples pour lesquelles une tumeur ne répondrait pas à ces traitements sont le manque de reconnaissance par les LT en raison de l'absence d'antigènes tumoraux et le défaut de recrutement de LT CD8⁺ au site tumoral (Gubin, Zhang et al. 2014). Cependant, dans les tumeurs où les LT CD8⁺ sont bien recrutés et activés au site tumoral, la résistance à ces immunothérapies peut être causée par la mort cellulaire

des LT CD8⁺ spécifiques de la tumeur via le mécanisme d'AICD dépendant de FasL (Zhu, Powis de Tenbossche et al. 2017) et du TNF (Bertrand, Montfort et al. 2017). Alternativement, les cellules cancéreuses peuvent exprimer des antigènes tumoraux mais développer des mécanismes pour éviter de les présenter à leur surface par le CMH, en raison d'altérations dans la machinerie de présentation des antigènes, telles que les sous-unités des transporteurs associés à la présentation des antigènes, TAP1 et TAP2, la bêta-2-microglobuline (B2M), ou la chaîne lourde du CMH lui-même (Marincola, Jaffee et al. 2000; Sucker, Zhao et al. 2014).

L'une des caractéristiques de l'immunothérapie anticancéreuse a été l'induction de réponses aux traitements durables. Cependant, l'apparition de patients qui ont répondu aux traitements pendant un certain temps et qui ont ensuite progressé (résistance acquise) augmente. Environ un quart à un tiers des patients atteints d'un mélanome métastatique qui ont développé des réponses objectives aux traitements utilisant des Acm anti-CTLA-4 ou anti-PD-1 rechute au cours du temps, même s'ils reçoivent le traitement de manière continue (Schachter, Ribas et al. 2017). Les mécanismes potentiels de rechute comprennent la perte des fonctions effectrices des LT CD8⁺, le manque de reconnaissance des cellules tumorales par les LT et le développement de variants tumoraux résistants.

Il est donc important d'identifier de nouveaux acteurs participant à la régulation des fonctions effectrices des LT CD8⁺ pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, et contrer ces mécanismes de résistance.

IV. Le récepteur neuronal « la Neuropiline-1 » participe-t-il à l'inhibition des fonctions des lymphocytes T CD8⁺ antitumoraux ?

La neuropiline-1 (Nrp-1) initialement connue sous le nom d'antigène A5, une protéine de surface des cellules neuronales (Fujisawa, Takagi et al. 1995), a été découverte pour la première fois dans des embryons de xénopes par l'équipe de Hajime Fujisawa (Takagi, Tsuji et al. 1987; Takagi, Hirata et al. 1991; Takagi, Kasuya et al. 1995). Par la suite une percée dans la compréhension de la fonction de la Nrp-1 s'est réalisée lorsqu'elle a été caractérisée quasiment en même temps par le groupe d'Alex Kolodkin et par celui de Marc Tessier-Lavigne, comme récepteur du facteur de guidage axonal, la sémaphorine-3A (Sema-3A) (He and Tessier-Lavigne 1997; Kolodkin, Levengood et al. 1997).

1. Structure de la Nrp-1

À ce jour, deux types de Nrps ont été identifiées, la Nrp-1 et la Nrp-2, exprimées par les cellules neuronales chez l'ensemble des vertébrés. Chez l'homme, les gènes codant pour la Nrp-1 et la Nrp-2 sont localisés sur les chromosomes (chrom) 10 et 2, tandis que chez la souris ils sont portés par les chrom 8 et 1, respectivement. Ces récepteurs ont été initialement découverts dans le système nerveux, comme étant impliqués dans le développement neuronal. Cependant, ils ont un rôle important dans de nombreux processus physiologiques, tels que le développement cardiaque, l'angiogenèse et l'immunité (Pellet-Many, Frankel et al. 2008).

Les Nrps sont des glycoprotéines de surface n'ayant pas de fonction tyrosine kinase associée. La Nrp-1 est constituée de 923 aa, pour un poids moléculaire d'environ 130 kDa. Celle-ci possède environ 44% d'homologie avec la séquence protéique de la Nrp-2. Cependant, des épissages alternatifs existent et peuvent ainsi générer des isoformes plus courtes de la Nrp-1 et la Nrp-2. La Nrp-1 et la Nrp-2 présentent une structure similaire, comprenant une large région extracellulaire N-terminale suivie d'une région transmembranaire et une courte queue cytosolique de 43-44 aa. La région extracellulaire contient deux domaines ayant une homologie de séquence avec les protéines du complément C1r/C1s (domaine a1/a2), deux domaines homologues aux facteurs de coagulation V/VIII (domaine b1/b2), suivi d'un domaine MAM (*meprin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu*) homologue à la protéase méprine (domaine c). Les domaines a1/a2 de ces récepteurs membranaires sont nécessaires pour la liaison des ligands qui appartiennent à la famille des sémaphorines. Les domaines b1/b2, caractéristiques des facteurs de coagulation et des protéines discoïdines, se lient quant à eux aux phospholipides anioniques à la surface des cellules, jouant ainsi un rôle dans l'adhésion cellulaire. Ces domaines b1/b2 sont aussi le site où des ligands, tels que les sémaphorines et les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFs), en particulier le VEGF₁₆₅, se fixent. Le domaine MAM quant à lui est important pour l'homo- ou l'hétérodimérisation

des Nrps. Le domaine cytoplasmique de ces récepteurs n'a pas d'activité de signalisation ou d'interaction connue à ce jour. Cependant, les trois derniers aa (Sérine-Glutamate-Alanine (SEA)) peuvent servir de plateforme pour la fixation de protéines intracellulaires à domaine PDZ (homologue aux protéines PSD-95/Dlg/ZO-1) (**Figure 10**). Cette particularité oblige les Nrps à s'associer à des co-récepteurs, tels que les Plexines de type A (PLXN-A) ou les récepteurs au VEGF (VEGFR), pour permettre la signalisation de leurs ligands respectifs (Pellet-Many, Frankel et al. 2008).

Les isoformes courtes des Nrps générées par l'épissage alternatif sont tronquées au niveau de la région C-terminale sur une longueur plus ou moins importante, et ne possèdent donc ni le domaine c, ni les domaines cytoplasmique et transmembranaire. Ces isoformes sont par conséquent solubles et peuvent ainsi jouer un rôle de « récepteurs leurres » en piégeant les ligands des formes membranaires de la Nrp-1 et la Nrp-2 dans le milieu extracellulaire.

L'appellation « Nrp-1 » fera uniquement référence à la forme longue et transmembranaire de la protéine tout au long du manuscrit.

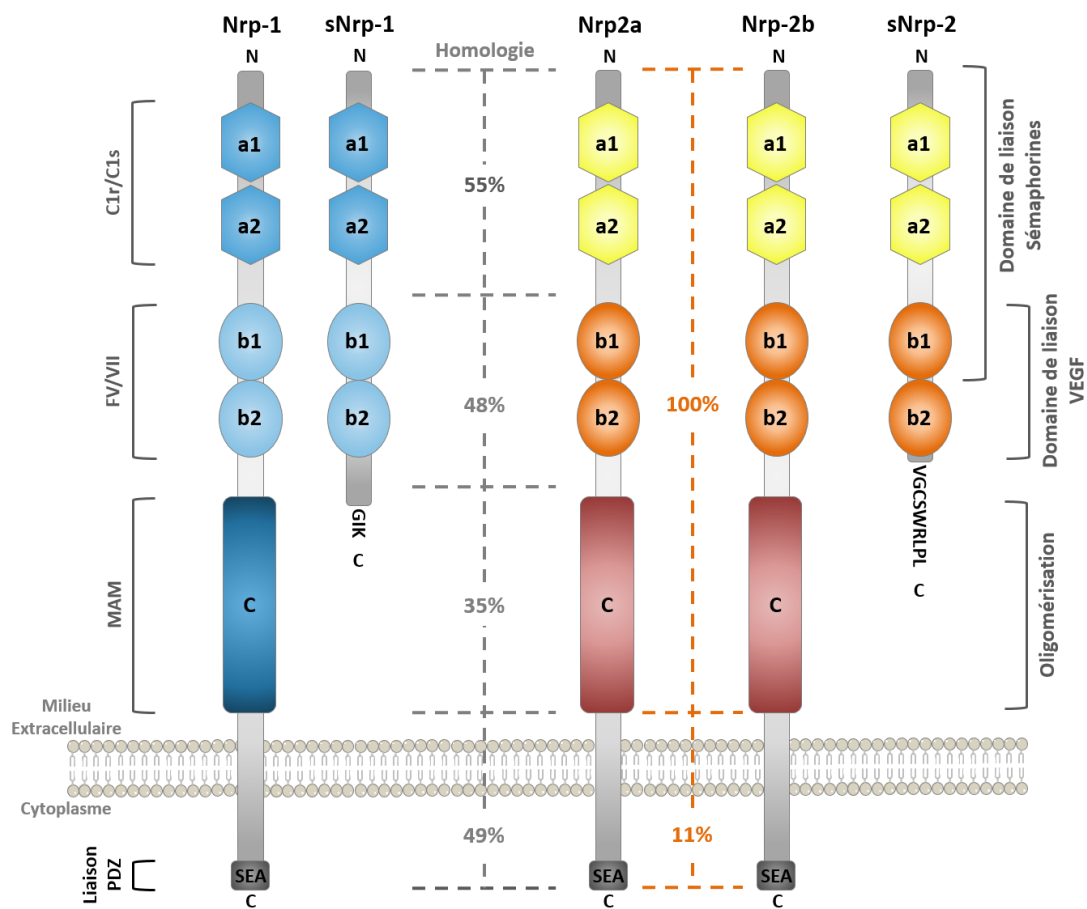


Figure 10 : Structure des Neuropilines

2. La Nrp-1 interagit avec un large répertoire de ligands

Les réponses cellulaires via la Nrp-1 sont différentes en fonction du ligand et du co-récepteur impliqués, faisant ainsi l'originalité et la complexité de ce récepteur. Ainsi, lorsque la Nrp-1 est stimulée par un de ces principaux ligands, les sémaphorines de classe 3 (Sema-3) ou les VEGFs, elle s'associe à des co-récepteurs présents à la surface cellulaire pour assurer les propriétés de transduction du signal. Par conséquent, il n'est pas surprenant que la Nrp-1 affecte divers processus biologiques, comme le développement cardiaque ou les réponses immunitaires (Kolodkin, Levengood et al. 1997; Soker, Takashima et al. 1998; Roy, Bag et al. 2017), et qu'elle joue un rôle important dans l'étiologie de nombreuses maladies, comme l'auto-immunité et le cancer (Pellet-Many, Frankel et al. 2008).

2.1. Les sémaphorines de classe 3

Les sémaphorines, découvertes il y a plus de vingt-cinq ans (Luo, Raible et al. 1993), font partie d'une large famille de protéines comprenant des formes transmembranaires et sécrétées. Cette famille composée de 28 membres différents, est impliquée principalement dans le guidage axonal agissant comme un facteur chimiorépulsif lors de la croissance des neurites pendant le développement du système nerveux central (SNC), mais est aussi impliquée au cours de la prolifération cellulaire, l'organogenèse, la vascularisation, l'angiogenèse et le cancer (Mark, Lohrum et al. 1997; Bielenberg, Shimizu et al. 2008; Pellet-Many, Frankel et al. 2008). Les sémaphorines sont composées de deux domaines conservés, un domaine appelé « SEMA », une séquence d'environ 500 aa, et d'un domaine appelé « PSI » (Plexines, sémaphorines et intégrines domaine) conservés, permettant de les classer dans cette famille (**Semaphorin Nomenclature Committee** (1999)). Les sémaphorines diffèrent les unes des autres selon leurs formes transmembranaires ou sécrétées, les domaines immunoglobulines et la présence ou non de domaine glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). Ces différences structurales ajoutées aux différences phylogéniques permettent de diviser cette famille de protéines en trois groupes différents et en huit classes distinctes : les sémaphorines de classe 1 et 2 exprimées par les organismes invertébrés, les sémaphorines de classe 3 à 7 spécifiques aux organismes vertébrés, et les sémaphorines de classe V uniquement exprimées par les virus (**Figure 11**).

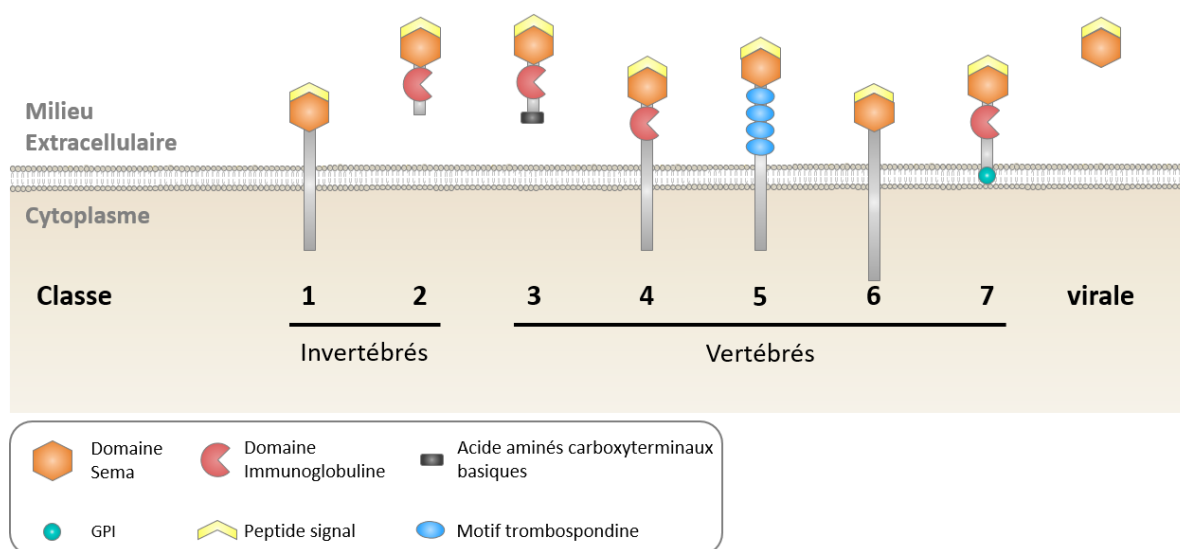


Figure 11 : Structure des différentes classes de sémaphorines

Les Sema-3 sont des protéines sécrétées et sont les seules à pouvoir se fixer sur les Nrps (He and Tessier-Lavigne 1997), en plus de la Sema-4A (Delgoffe, Woo et al. 2013). Il est connu que les Sema-3 n'ont pas la même affinité pour les Nrp-1 et Nrp-2. Ainsi la Sema-3A interagit préférentiellement avec la Nrp-1, tandis que la Sema-3C et la Sema-3F ont plus d'affinités pour la Nrp-2 (**Figure 12A**). La Sema-3A se lie à la Nrp-1 via l'interaction de son domaine Sema aux domaines a1/a2 de la Nrp-1, ainsi que par sa région C-terminale riche en résidus basiques qui interagit quant à elle avec les domaines b1/b2 de la Nrp-1 (He and Tessier-Lavigne 1997; Antipenko, Himanen et al. 2003). Comme décrit précédemment, la Nrp-1 ne possède pas un domaine intracellulaire suffisamment long pour induire une signalisation, et doit donc être associée à un co-récepteur. De ce fait, les plexines de type A (PLXN-A) sont des co-récepteurs indispensables à l'induction de la signalisation des Sema-3. Ainsi les PLXN-A1 et -A4 sont les co-récepteurs préférentiels de la Nrp-1, alors que les PLXN-A2 et -A3 coopèrent avec la Nrp-2 (Yaron, Huang et al. 2005). Les plexines sont de longs récepteurs transmembranaires comprenant un domaine extracellulaire composé d'un domaine Sema, de deux régions riches en cystéines appelées domaines MRS (*Met-Related Sequences*), et de trois à quatre domaines de type immunoglobuline. La région intracellulaire contient deux domaines homologues à des protéines à activité Ras-GAP (Oinuma, Ishikawa et al. 2004). Lorsque le complexe Sema-3A, Nrp-1, PLXN-A1/A4 se forme à la surface des neurones (**Figure 12B**), la partie intracellulaire des PLXN permet une signalisation et provoque une rétraction subite avec perte de motilité du cône de croissance de ces cellules (Takahashi, Fournier et al. 1999; Tamagnone, Artigiani et al. 1999). À cette étape, une activation des GTPases de la famille des protéines Rho provoque des modifications de l'assemblage d'actine, entraînant alors un changement de conformation du réseau d'actine. Ceci engendre un changement directionnel, et plus particulièrement une chimiorépulsion des neurones (Kruger, Aurandt et al. 2005). Cependant dans certains cas, la Sema-3A peut avoir une action

attractante due à une forte activité des GMP cycliques (cGMP) intracellulaires (Song, Ming et al. 1998; Polleux, Morrow et al. 2000).

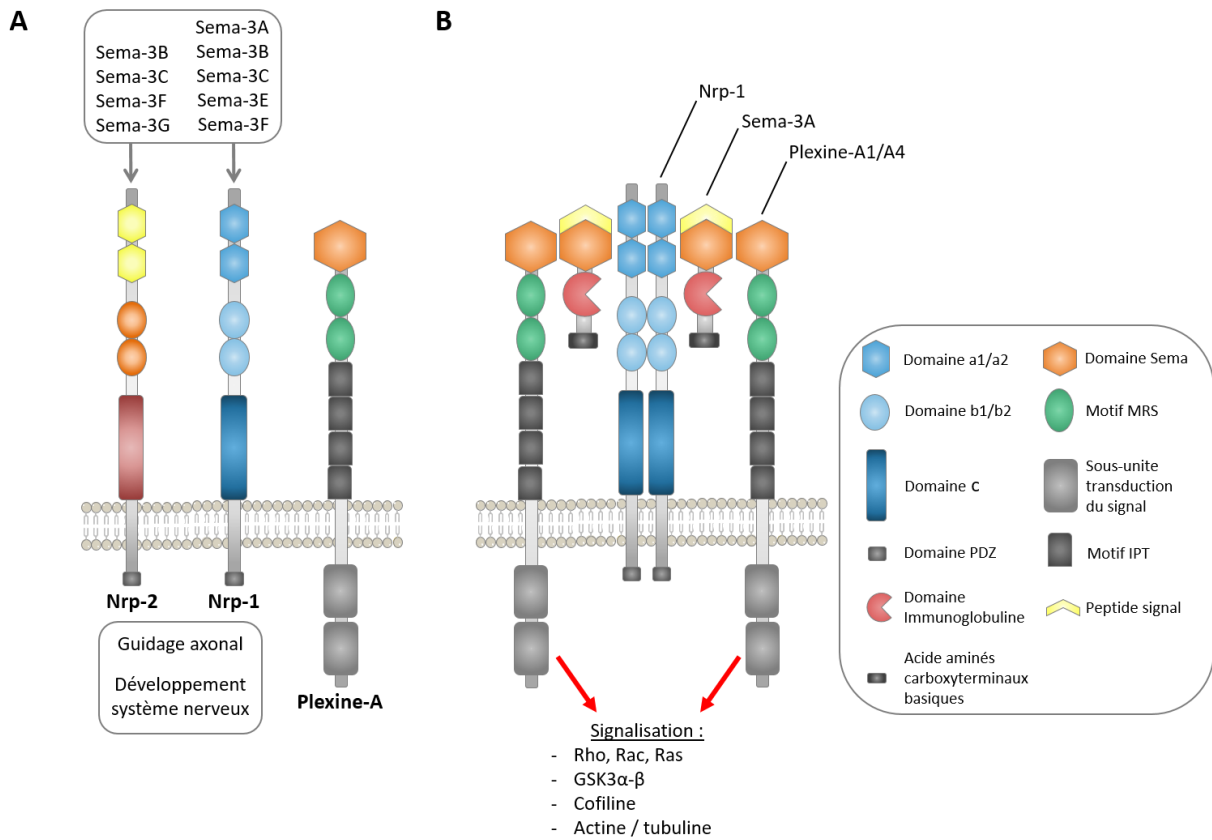


Figure 12 : Les Neuropilines et les sémaphorines de classe 3

(A) Liste des différentes sémaphorines de classe 3 se fixant sur la Nrp-1 et la Nrp-2. (B) Représentation du complexe du récepteur à la Sema-3A.

2.2. Les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire

Les VEGFs jouent un rôle primordial dans la vasculogenèse (formation embryonnaire des premiers vaisseaux sanguins à partir de cellules précurseurs hématopoïétiques) et l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants qui se produit au cours du développement embryonnaire, mais aussi chez l'adulte) nécessaires pour accompagner la croissance des tissus, le développement des organes du corps humain, et la croissance des tumeurs (Senger, Galli et al. 1983; Millauer, Wизigmann-Voos et al. 1993). Les VEGFs interagissent avec les Nrps qui agissent comme des co-récepteurs pour les VEGFRs (**Figure 13A**). La liaison des VEGFs aux Nrps améliore la signalisation du complexe VEGF/VEGFR (Soker, Takashima et al. 1998; Gluzman-Poltorak, Cohen et al. 2000). Les VEGFs sont des glycoprotéines antiparallèles homodimériques de 40 kDa sécrétées, liées de manière covalente par deux ponts disulfure intermoléculaire. Chez les mammifères, la famille des VEGFs est composée de cinq membres : VEGF-A, -B, -C, -D et le facteur de croissance placentaire (PlGF) (Zachary and Gliki 2001; Ferrara, Gerber et al. 2003). L'épissage

alternatif génère de multiples isoformes des VEGFs qui diffèrent par leur affinité et leur spécificité de récepteurs. Le VEGF-A a au moins six isoformes différentes : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ qui sont dotées de propriétés biologiques distinctes (Neufeld, Cohen et al. 1996; Poltorak, Cohen et al. 1997). Ces VEGFs lient et activent trois types de récepteurs à activité tyrosine kinase, les VEGFR 1/2/3, encore appelés Flt1, KDR/Flk-1 et KDR/Flk-4. Le VEGFR1 est essentiel à la régulation de la migration des précurseurs endothéliaux ainsi que des monocytes/macrophages matures. Le VEGFR2 est le principal transducteur de la fonction du VEGF dans les cellules endothéliales vasculaires, tandis que le VEGFR3 est nécessaire pour la fonction endothéliale lymphatique (Alitalo and Carmeliet 2002). Ainsi, la co-expression de la Nrp-1 avec le VEGFR2 renforce la liaison du VEGF-A à ce dernier, la phosphorylation du VEGFR2 ainsi que la signalisation intracellulaire et la migration induite par le VEGFR2 (Whitaker, Limberg et al. 2001). Cependant, la Nrp-1 n'est nécessaire ni pour la liaison de haute affinité du VEGF-A au VEGFR2, ni pour l'activation des voies de signalisation en aval de l'interaction VEGF-A/VEGFR2 (Pellet-Many, Frankel et al. 2008). L'isoforme la plus active et la plus abondante chez les mammifères est le VEGF₁₆₅, et elle est capable d'interagir avec la Nrp-1 et la Nrp-2. Les domaines b1/b2 de la Nrp-1 sont essentiels pour la liaison du VEGF₁₆₅, tandis que les domaines a1/a2 sont facultatifs. Le domaine C-terminal du VEGF₁₆₅ codé par les exons 7 et 8, est essentiel pour la reconnaissance et la liaison aux Nrps (**Figure 13B**). Une nouvelle isoforme, le VEGF_{165b} qui diffère du VEGF₁₆₅ au niveau du domaine C-terminal, est incapable d'induire la prolifération de cellules endothéliales, ou l'angiogenèse (Woolard, Wang et al. 2004). Ceci est sûrement dû à son inaptitude à lier la Nrp-1, empêchant ainsi la signalisation cytoplasmique du VEGFR2. Il n'y a pas que la structure des isoformes des VEGF-A qui jouent un rôle pour la liaison avec la Nrp-1. En effet, l'héparine ainsi que la densité de la Nrp-1 présente à la surface cellulaire ont un effet sur l'interaction VEGF-A/Nrp-1 tout du moins *in vitro* (Fuh, Garcia et al. 2000; Ashikari-Hada, Habuchi et al. 2005). Pour les autres membres de la famille des VEGFs, le VEGF-B est connu pour interagir avec la Nrp-1 (Karpanen, Heckman et al. 2006), tandis que les ligands du VEGFR3, VEGF-C et VEGF-D, se lient à la Nrp-1 ainsi qu'à la Nrp-2 (Karpanen, Heckman et al. 2006). Quant au PlGF-2, il se lie également à la Nrp-1 (Migdal, Huppertz et al. 1998).

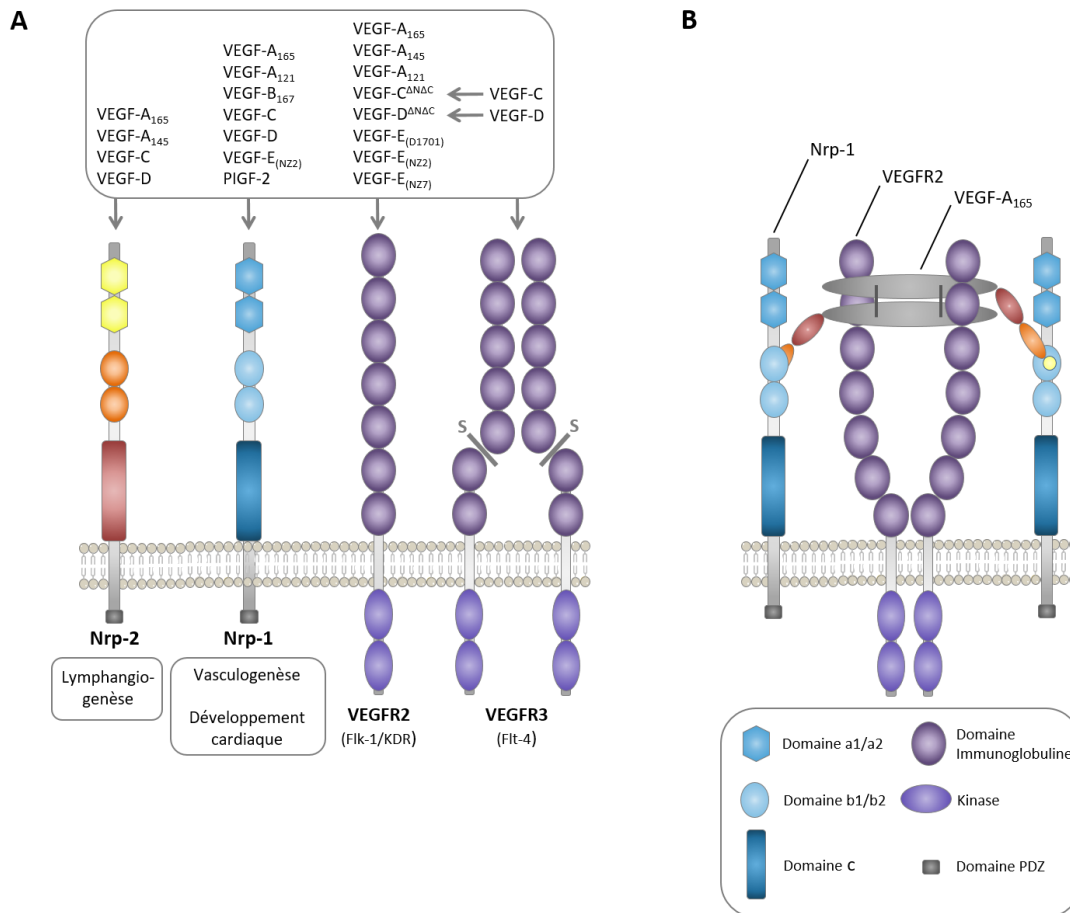


Figure 13 : Les Neuropilines et VEGF

(A) Liste des VEGFs se fixant sur les Nrps et les VEGFRs. (B) Représentation du complexe du récepteur au VEGF-A₁₆₅.

2.3. Autres ligands

2.3.1. Nrp-1 et EGF/EGFR

La Nrp-1 peut physiquement interagir avec le récepteur de l'EGF (*Epidermal growth factor*) (EGFR) à la surface cellulaire (Rizzolio, Rabinowicz et al. 2012). En réponse aux ligands de l'EGFR, cette association est renforcée et accompagnée de la formation de *clusters* (groupes de récepteurs) qui est dépendante de l'expression de la Nrp-1 (Sorkin 2001; Sorkin and Goh 2008). Ainsi la modulation de l'expression de la Nrp-1 perturbe la fonction de l'EGFR, impactant par conséquent son activité fonctionnelle (Rizzolio, Rabinowicz et al. 2012).

2.3.2. Nrp-1 et TGF-β/ TGF-βR

La Nrp-1 agit aussi comme un co-récepteur pour le TGF-β, favorisant l'activité de la voie de signalisation du TGF-β *via* SMAD2/3 (Glinka, Stoilova et al. 2011). Par ailleurs, la Nrp-1 est aussi capable d'activer la forme latente du TGF-β (LAP-TGF-β) via son domaine b1/b2. Elle peut aussi augmenter l'affinité du TGF-β pour ses récepteurs, TGF-βRI/II/III, en liant et reliant les récepteurs

entre eux, formant ainsi un complexe de récepteurs au TGF- β (Glinka and Prud'homme 2008; Glinka, Stoilova et al. 2011).

2.3.3. Nrp-1 et HGF/c-Met

La surexpression de la Nrp-1 dans les cellules cancéreuses du pancréas favorise l'invasion tumorale et la signalisation du récepteur c-Met induite par le facteur de croissance HGF (*Hepatocyte growth factor*) (Matsushita, Gotze et al. 2007). De plus, la Nrp-1 peut s'associer à c-Met ainsi qu'à son ligand l'HGF, favorisant ainsi la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Sulpice, Plouet et al. 2008). L'expression de la Nrp-1 dans les cellules de gliomes améliore l'activation de la voie de signalisation autocrine HGF/c-Met conduisant à la progression tumorale (associée à une augmentation de la survie des cellules cancéreuses, leur prolifération et l'angiogenèse) (Hu, Guo et al. 2007). Curieusement, le ligand de la Nrp-1, le VEGF₁₆₅, transactive le complexe Nrp-1/c-Met indépendamment de son récepteur habituel le VEGFR2 (Zhang, Zhau et al. 2010). Ainsi, la Nrp-1 semble être aussi impliquée dans la fonctionnalité du complexe HGF/c-Met, bien que les détails moléculaires de cette interaction n'aient pas été clairement élucidés.

2.3.4. Nrp-1 et PDGF/PDGFR

La Nrp-1 favorise la motilité des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) en réponse au PDGF sécrété par les cellules cancéreuses du sein (Banerjee, Sengupta et al. 2006). À l'inverse, l'extinction de l'expression de la Nrp-1 nuit à la migration de ces cellules (Pellet-Many, Frankel et al. 2011). Le complexe formé par la Nrp-1 et le PDGFR régule également la migration des cellules souches mésenchymateuses et pourrait impacter leur rôle dans la néoangiogenèse et le remodelage tissulaire (Ball, Bayley et al. 2010), ainsi que leur recrutement dans les tumeurs et leur différenciation en péricytes (Dhar, Dhar et al. 2010).

2.3.5. Nrp-1 et les intégrines

La Nrp-1 peut aussi interagir avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ au niveau des sites d'adhésion cellulaires, indépendamment des ligands VEGFs et de la Sema-3A, favorisant ainsi l'adhésion des cellules endothéliales à la fibronectine ; processus crucial pour le développement vasculaire (Valdembri, Caswell et al. 2009). Le domaine cytoplasmique de la Nrp-1, en recrutant l'adaptateur GIPC, intervient dans l'internalisation et le recyclage de l'intégrine dans les endosomes précoces, favorisant de cette façon la migration des cellules endothéliales (Valdembri, Caswell et al. 2009)

En parallèle, dans le mélanome, l'intégrine $\alpha \beta 5$ semble être un effecteur critique de la Nrp-1 pour provoquer l'invasion des cellules tumorales et la formation de structures vasculaires (Ruffini, Graziani et al. 2015).

2.3.6. Nrp-1 et B7-H4

Pour finir, le récepteur B7-H4 (B7x), appartenant à la famille des récepteurs B7 (CD80, CD81, PD-L1,...), interagirait avec la Nrp-1 (Podojil, Chiang et al. 2018). Cependant, l'équipe de Xingxing Zang, n'a pas montré d'interaction directe entre B7x et la Nrp-1 (Ohaegbulam, Liu et al. 2017), laissant penser que cette interaction nécessite différents intermédiaires et que l'ensemble du complexe Sema-3A/Plexine-A4/Nrp-1 serait nécessaire (Podojil, Chiang et al. 2018).

Ainsi, la particularité de la Nrp-1 est qu'elle agit comme un récepteur de surface « plateforme/adaptateur ». Cela est lié en partie à sa capacité à interagir avec un large répertoire de récepteurs, incluant des récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque (tels qu'EGFR et c-Met) et des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase intrinsèque (tel que le TGF- β R), des intégrines et des molécules d'adhésion cellulaires. De plus, la Nrp-1 peut augmenter la liaison de certains ligands à leurs récepteurs, tels que l'HGF, le PDGF et le TGF- β , favorisant par conséquent leur activité. Toutefois, les preuves d'une liaison fonctionnelle de haute affinité des facteurs extracellulaires autres que les VEGF et les Sema-3 à la Nrp-1 ne sont pas encore concluantes et nécessitent d'être approfondies.

3. Rôles physiologiques et pathologiques

3.1. Rôle de la Nrp-1 dans le système nerveux central et vasculaire

L'étude de la Nrp-1 dans divers modèles animaux (poulet, xénope, rat et souris en particulier) a permis de mettre en lumière son rôle majeur dans le système nerveux et le système cardiovasculaire. En particulier, l'utilisation de souris transgénique pour le gène codant la Nrp-1 a permis d'élucider le rôle prépondérant de ce récepteur et ses différents ligands dans le développement de ces deux systèmes biologiques (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Phénotype des souris génétiquement modifiées pour la Neuropiline-1

Génotype	Phénotype	Référence
<i>Nrp1</i>^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de la Nrp-1 dans l'ensemble des cellules de la souris - Meurent entre 10.5 et 13.5 jours <i>post coïtum</i> - Défauts majeurs au niveau cardiovasculaire et neuronal 	(Kitsukawa, Shimizu et al. 1997; Kawasaki, Kitsukawa et al. 1999)
<i>Nrp1</i>^{Tg}	<ul style="list-style-type: none"> - Surexpression de la Nrp-1 dans l'ensemble des cellules de la souris - Meurent au stade embryonnaire - Excès de capillaires sanguins, hémorragies - Défasciculation de fibres nerveuses 	(Kitsukawa, Shimono et al. 1995)
<i>Nrp1</i>^{Endo-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de la Nrp-1 spécifiquement dans les cellules endothéliales - Meurent au stade embryonnaire tardif - Vascularisation anormale peu ramifiée, et défauts cardiaques 	(Gu, Rodriguez et al. 2003)
<i>Nrp1</i>^{Sema-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Mutation <i>Knock-In</i> dans le domaine a1 rendant impossible la fixation des Sema-3, principalement de la Sema-3A, mais n'affecte pas la fixation du VEGF sur la Nrp-1 - Survivent à la naissance mais beaucoup de mortalité post-natale - Défasciculation des nerfs craniaux et spinaux, et connections nerveuses sensorielles aberrantes - Pas de défaut cardiovasculaire 	(Gu, Rodriguez et al. 2003)

Il est bien établi que la Nrp-1 et ses ligands, les Sema-3, sont directement impliqués dans le processus de guidage axonal au cours de la mise en place du SNC chez l'embryon (Fujisawa, Kitsukawa et al. 1997), et agissent sur la croissance axonale soit par contact direct soit à distance. En fonction de la Sema-3 impliquée et du territoire neuronal, un effet chiomiorépulsif ou au contraire chiomioattractant est observé. Dans ce processus, le rôle de la Sema-3A a été le plus étudié. Ainsi les dendrites qui ont une concentration cytosolique élevée en GMPc sont attirées par les gradients de Sema-3A, tandis que les axones sont rejetés de ces zones fortement concentrées en Sema-3A, car ils ont une faible quantité cytosolique de GMPc. De plus, l'expression de la Nrp-1 par les axones est nécessaire à la formation de nerfs. Il est important de noter que la Nrp-2 avec son ligand la Sema-3F (Nrp-2/Sema-3F) joue un rôle non-redondant avec celui du couple Nrp-1/Sema-3A dans l'organisation du système nerveux au cours du développement. De ce fait, les neurones n'exprimant pas la Nrp-1 mais plutôt la Nrp-2 peuvent envahir les zones où la Sema-3A est présente, complexifiant ainsi l'organisation et la mise en place du système nerveux. Bien que les défauts de développement du système nerveux soient importants en l'absence de la Nrp-1, ce sont véritablement les défauts de développement du système cardiovasculaire qui causent la mort des souris *Nrp1*^{-/-} au stade embryonnaire (Kitsukawa, Shimizu et al. 1997; Kawasaki, Kitsukawa et al. 1999). Dans les premiers stades du développement de l'embryon de poulet, l'expression de la Nrp-1

et de la Nrp-2 semble être clairement opposée au niveau vasculaire. Ainsi la Nrp-1 est exprimée sur les artères, tandis que la Nrp-2 est spécifique des veines. Cependant, à un stade plus tardif, cette différence d'expression ne permet plus de distinguer les artères des veines, car les cellules endothéliales expriment uniquement la Nrp-1. De ce fait, la Nrp-1 contribue largement au processus d'angiogenèse, mécanisme clé dans le développement du système cardiovasculaire, et qui est étroitement régulé par une multitude de voies de signalisation. Dans des conditions physiologiques, l'angiogenèse survient à la fois au cours du développement embryonnaire et périnatal, tandis que l'endothélium adulte est habituellement en état de repos et ne prolifère que dans des circonstances spécifiques ou pathologiques, par exemple au cours du cycle utérin, pendant la grossesse ou la cicatrisation de plaie. L'étude des embryons de souris *Nrp1*^{-/-} suggère un rôle crucial de la Nrp-1 dans la migration des cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins, propriété nécessaire à l'angiogenèse embryonnaire et qui est dépendante de l'action du VEGF. En parallèle, la comparaison entre des souris invalidées pour le gène *Nrp1* spécifiquement dans les cellules endothéliales (souris *Nrp1*^{Endo^{-/-}) et des souris dont la protéine Nrp-1 est spécifiquement mutée dans son domaine a1/a2, domaine de fixation de la Sema-3A (souris *Nrp1*^{Sema^{-/-}), a permis de mettre en évidence que les fonctions de la Nrp-1 dans le développement embryonnaire dépendent de deux facteurs. Le premier étant le type cellulaire exprimant la Nrp-1 (cellules neuronales *versus* cellules endothéliales), et le second étant le ligand agissant sur ces cellules (Sema-3 *versus* VEGF) (Gu, Rodriguez et al. 2003).}}

3.2. Rôle de la Nrp-1 dans le système immunitaire

Ces dernières années, plusieurs études ont montré que les Nrps sont aussi exprimées dans de nombreuses populations de cellules immunitaires, jouant potentiellement un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (**Tableau 3**). Dans ce contexte, l'expression et la fonction de la Nrp-1 ont été principalement caractérisées dans les cellules T, en particulier dans les Tregs, ainsi que dans les DC. En revanche, la fonction de la Nrp-2 n'est pas clairement établie.

Tableau 3 : Expression et rôle de la Neuropiline-1 dans les cellules immunitaires

	Expression Cellules immunitaires	Fonctions	Maladies associées	Références
Neuropiline-1	Cellules Dendritiques • DC plasmacytoïde (pDC)	<ul style="list-style-type: none"> • Rôle dans la production d'IFNγ et la clairance virale • Augmente la susceptibilité d'infection au virus HTLV-1 • Migration et induction de l'immunosuppression des DC infiltrant les tumeurs, corrélation avec la progression de la maladie 	<ul style="list-style-type: none"> • Infection virale • Infection par un rétrovirus • Cancer 	(Grage-Griebenow, Loseke et al. 2007; Jones, Petrow-Sadowski et al. 2008; Piechnik, Dmoszynska et al. 2013)
	• DC myéloïde	<ul style="list-style-type: none"> • Formation de la synapse immunologique avec les LTs • Induction de la tolérance immunitaire • Réorganisation du cytosquelette d'actine permettant la transmigration des DC à travers l'endothélium lymphatique • Augmente la susceptibilité d'infection au virus HTLV-1 		(Tordjman, Lepelletier et al. 2002; Ghez, Lepelletier et al. 2006; Lepelletier, Moura et al. 2006; Takamatsu, Takegahara et al. 2010)
	Macrophage Microglie	<ul style="list-style-type: none"> • Développement vasculaire • Induction de la polarisation en type M2, phagocytose, induction de Tregs, et immunosuppression • Migration dans les zones hypoxiques de tumeurs solides • Activités protumorales des TAMs • Régulation négative de la prolifération des TAMs dans certaines tumeurs via la liaison avec Sema-3A 	<ul style="list-style-type: none"> • EAE • Cancer • Cancer • Cancer 	(Fantin, Vieira et al. 2010; Casazza, Laoui et al. 2013; Aung, Ohe et al. 2016; Dejda, Mawambo et al. 2016; Miyauchi, Chen et al. 2016; Nissen and Tsirka 2016; Wallerius, Wallmann et al. 2016)
	Ostéoclastes	<ul style="list-style-type: none"> • Ostéoprotection en empêchant l'ostéoclastogénèse, et induction de la formation d'ostéoblastes 		(Hayashi, Nakashima et al. 2012)
	Cellules T • Thymocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Adhésion aux cellules épithéliales thymiques • Réorganisation de l'actine • Sortie du thymus 		(Lepelletier, Smaniotto et al. 2007)
	• Treg	<ul style="list-style-type: none"> • Immunosuppression et tolérance • Recrutement des Tregs au site tumoral • Stabilité et fonction des Tregs 	<ul style="list-style-type: none"> • EAE • GVHD • Cancer 	(Sarris, Andersen et al. 2008; Solomon, Mueller et al. 2011; Hansen, Hutzler et al. 2012; Delgoffe, Woo et al. 2013)
	• Tfh	<ul style="list-style-type: none"> • Différenciation des LB • Migration et rétention des Tfh dans les centres germinaux secondaires des organes lymphoïdes 	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphome T angio-immunoblastique 	(Renand, Milpied et al. 2013)
	• LT CD8 ⁺ activés	<ul style="list-style-type: none"> • Fonction inconnue 		(Kaech, Hemby et al. 2002)
	• NKT	<ul style="list-style-type: none"> • Rôle dans le développement • Sortie du thymus • Interaction iNKT et macrophage 		(Milpied, Massot et al. 2011)
	Basophiles	<ul style="list-style-type: none"> • Fonction inconnue 		(de Paulis, Prevete et al. 2006)
	Mastocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Fonction inconnue 		(Marone, Varricchi et al. 2016)

3.2.1. Les macrophages

Les macrophages résidents dans les tissus expriment la Nrp-1 à leur surface, mais la fonction précise de ce récepteur pour cette population immunitaire reste inconnue (Wilson, Shao et al. 2018). Plus récemment, un lien entre les macrophages exprimant la Nrp-1 et la réponse immunitaire antitumorale a été mis en lumière (Casazza, Laoui et al. 2013). En effet, les macrophages qui envahissent les tissus tumoraux peuvent être polarisés en un type immunosuppresseur et pro-tumoral (TAM de type 2). Ces TAMs contribuent à la progression de la maladie en libérant des facteurs angiogéniques et favorisent l'induction de la tolérance immunitaire. Le recrutement de ces cellules au niveau des zones hypoxiques tumorales est primordial pour leurs activités pro-tumorales. La Nrp-1 exprimée par les TAMs contrôle leur localisation dans les zones tumorales hypoxiques où elles acquièrent par la suite leurs propriétés immunosuppressives. Ce mécanisme est régulé par la Sema-3A en interagissant avec le complexe Nrp-1/PLXN-A1-A4 présent à la surface des macrophages, ainsi que le VEGF. Ces deux molécules, la Sema-3A et le VEGF, permettent l'attraction des TAMs des sites normoxiques (périvasculaires) vers les sites hypoxiques (avasculaires) par transactivation du récepteur VEGFR1. Une fois dans l'environnement hypoxique, la Nrp-1 est réprimée au niveau transcriptionnel dans les TAMs, qui perdent alors leur capacité migratoire en réponse à la Sema-3A. Cela déclenche un signal d'arrêt et retient les TAMs dans le microenvironnement hypoxique de la tumeur. La déplétion de la Nrp-1 permet d'inhiber la migration des TAMs et de les maintenir dans les zones normoxiques périphériques des tumeurs, et par conséquent abroger leurs fonctions protumorales (Casazza, Laoui et al. 2013; Rivera and Bergers 2013).

3.2.2. Les cellules dendritiques

- **La Nrp-1 marqueur des DC plasmacytoïdes**

L'expression de la Nrp-1 sur des DC a été mise en évidence pour la première fois en 2000 (Dzionic, Fuchs et al. 2000). Au cours de recherches visant à trouver des marqueurs spécifiques de DC humaines, la Nrp-1 a été identifiée comme étant analogue à l'antigène BDCA4 exprimé par les DC plasmacytoïdes (pDC) (Dzionic, Fuchs et al. 2000). Les pDC sont des cellules immunitaires innées qui produisent de grandes quantités d'IFNs de type I (α et β), et jouent un rôle crucial dans les réponses antivirales de l'hôte (Reizis, Bunin et al. 2011). Par conséquent, la fonction de la Nrp-1 pour cette population de DC a été largement caractérisée dans le contexte de défense antivirale. Le traitement des pDC avec un Acn anti-Nrp-1 neutralisant résulte en une diminution de la production d'IFN- α induite par l'infection, suggérant un rôle immunorégulateur de la Nrp-1 dans ce contexte particulier (Grage-Griebenow, Loseke et al. 2007). Toutefois, les mécanismes qui sous-tendent cet effet restent indéterminés et demandent à être caractérisés plus en détails. En outre, certains virus utilisent ce

récepteur pour infecter les cellules immunitaires. Ainsi, le virus HTLV-1, via la Nrp-1, infecte principalement les pDC ou les DC matures, infectant par la suite les LT CD4⁺ lors des interactions entre ces deux types cellulaires (Ghez, Lepelletier et al. 2006; Jones, Petrow-Sadowski et al. 2008; Kusunoki, Tanaka et al. 2018).

- **La Nrp-1 est impliquée dans la migration des DC**

La Nrp-1 est également impliquée dans la transmigration des DC vers les vaisseaux lymphatiques (Takamatsu, Takegahara et al. 2010). En effet, après exposition à l'antigène, les DC migrent des tissus périphériques puis transmigrent à travers l'endothélium lymphatique pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires, pour activer les LTs spécifiques de l'antigène. Lors de la liaison de la Sema-3A (sécritée par les cellules endothéliales lymphatiques) au complexe PLXN-A1/Nrp-1 (exprimée par les DC murines), la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine est induite conduisant à la contraction de l'actomyosine. De cette manière, les DC peuvent passer à travers des espaces étroits, en particulier entre les cellules endothéliales lymphatiques.

- **La Nrp-1 est cruciale dans les interactions entre les DC et les lymphocytes T**

Comme évoqué précédemment, la Nrp-1 est exprimée en particulier sur les pDC. Cependant, elle peut être également exprimée par les LT CD4⁺ et CD8⁺ activés (Lepelletier, Moura et al. 2006). En effet, lors d'un contact initial entre les DC et les LT au repos, l'expression de la Nrp-1 sur les LT est induite (Lepelletier, Moura et al. 2006). Par la suite, la Nrp-1 migre au niveau de la SI entre la DC et le LT. Ainsi l'inhibition de la Nrp-1 par un anticorps bloquant empêche l'activation et la prolifération des LT. Ceci suggère que la Nrp-1, par une liaison homotypique, permettrait une stabilisation de l'interaction entre ces deux types cellulaires. En outre, la Sema-3A sécrétée par les DC et les LT activés peut aussi se lier sur la Nrp-1 et perturber la liaison homotypique, inhibant ainsi l'activation des LT. Par conséquent, la Nrp-1 jouerait un rôle de médiateur dans les interactions entre les DC et les LT, et elle serait essentielle pour initier la réponse immunitaire primaire dans les ganglions lymphatiques (Lepelletier, Moura et al. 2006). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour déterminer comment et dans quelle mesure ces interactions sont pertinentes dans un contexte physiologique ou pathologiques tel que le cancer.

3.2.3. Les lymphocytes

- **La Nrp-1 et le développement des cellules T dans le thymus**

Chez l'homme, la Nrp-1 est exprimée à la fois dans le cortex et la medulla du thymus. L'étude d'expression *in situ* et *in vitro* a révélé que la Nrp-1 est également exprimée par les différentes sous-populations de thymocytes définies par les marqueurs CD4 et CD8, les DC et les cellules épithéliales

thymiques (TEC). La Nrp-1 est recrutée spécifiquement au niveau de la zone de contact entre les thymocytes et les TEC, suggérant qu'elle serait impliquée dans le développement des thymocytes (Lepelletier, Smaniotto et al. 2007). L'expression de la Nrp-1 à la surface des thymocytes est rapidement induite après stimulation du TCR en combinaison avec l'IL-7, ou après adhésion aux TECs. La Sema-3A est également présente au sein du thymus humain, à la fois dans les thymocytes et les TECs, et est plus fortement exprimée dans les thymocytes après l'engagement du TCR. La Sema-3A induit une baisse de l'adhésion des thymocytes exprimant la Nrp-1, et favorise leur migration en exerçant un effet répulsif. L'interaction Nrp-1/Sema-3A jouerait donc un rôle important dans le contrôle du développement des thymocytes.

Chez la souris, l'expression de la Nrp-1 n'est pas ou peu retrouvée à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺ matures, mais uniquement aux stades précoces de la différenciation des thymocytes et sur la population mature des Treg (Corbel, Lemarchandel et al. 2007). L'utilisation de souris invalidées pour le gène *Nrp1* spécifiquement dans le « lignage » des LT, ne montre pas de défaut majeur au niveau du développement thymique, ni de la maturation des LT. Cependant, la Nrp-1, via la Sema-3A, a été décrite pour participer au développement thymique chez la souris également (Mendes-da-Cruz, Lepelletier et al. 2009).

- **La Nrp-1 et les lymphocytes T auxiliaires folliculaires**

La Nrp-1 est exprimée sélectivement par les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh), un sous-ensemble spécifique de cellules T qui aide à la différenciation des LB et à la formation des centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires humains, ce qui conduit à la génération de plasmocytes et de LB mémoire (Renand, Milpied et al. 2013). Cette étude a montré que la Nrp-1 exprimée par les cellules Tfh contribue à la différenciation des LB *in vivo* et *in vitro*. De plus, la Nrp-1 est exprimée par des cellules malignes de type Tfh dans le lymphome angio-immunoblastique à cellules T (AITL), qui est associé à une différenciation élevée des LB. Ainsi la Nrp-1 pourrait être considérée comme un marqueur spécifique des cellules Tfh et un facteur pronostique utile pour les néoplasmes malins associés à l'activité des cellules Tfh.

- **La Nrp-1 et les lymphocytes T régulateurs**

Les Tregs sont de puissantes cellules immunosuppressives qui sont associées à l'homéostasie immunitaire, la tolérance périphérique, et la prévention des maladies auto-immunes ainsi qu'à des pathologies telles que le cancer, l'allergie et la tolérance aux greffes. Ceci est attribué à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF- β , les Gzms A/B, l'expression d'iRs, et l'altération du fonctionnement des T_{eff} par la perturbation métabolique et l'immunomodulation des

DC. Les Tregs comportent deux types majeurs, les Treg naturels (nTreg) qui prennent naissance dans le thymus, et les Treg périphériques (iTreg) qui sont induits en périphérie à partir de LT CD4⁺ conventionnels. Le rôle inhibiteur des Tregs a été étudié dans plusieurs maladies inflammatoires chez la souris et l'homme. Cette population immunitaire est généralement identifiée sur la base de la co-expression de CD4, CD25 et du facteur de transcription FoxP3. La Nrp-1 est constitutivement exprimée sur les nTreg murins, indépendamment de leur état d'activation. Son expression corrèle avec l'activité immunosuppressive des nTreg, et permet donc de les distinguer des iTreg chez la souris (Weiss, Bilate et al. 2012; Yadav, Louvet et al. 2012). Cependant, l'expression de la Nrp-1 sur les Treg humains est assez controversée. En effet, contrairement aux cellules Treg murines, il semblerait que les cellules Treg FoxP3⁺ humaines n'expriment pas spécifiquement la Nrp-1. Dans une étude récente, les auteurs ont réalisé plusieurs expériences qui n'ont pas permis de démontrer une expression claire de la Nrp-1 dans les cellules Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ humaines dérivées du sang, du thymus, de la rate, des ganglions lymphatiques périphériques et des amygdales (Milpied, Renand et al. 2009). Toutefois dans certains types de tumeurs humaines, une partie des Tregs expriment la Nrp-1 à leur surface (Battaglia, Buzzonetti et al. 2008; Chaudhary and Elkord 2015; Overacre-Delgoffe, Chikina et al. 2017). Des études plus approfondies sont donc nécessaires pour déterminer la régulation de l'expression de la Nrp-1 sur les Tregs humains, et évaluer si la Nrp-1 peut être pressentie comme un marqueur fiable des nTregs capable de distinguer cette population immunitaire chez l'Homme.

Comme mentionné précédemment, la Nrp-1 est importante dans la formation de la SI entre les DC et les LT, permettant ainsi l'activation et prolifération des LT. Cependant les DC immatures forment préférentiellement une SI avec les Tregs. Celle-ci est abrogée en présence d'un anticorps anti-Nrp-1 bloquant. Cependant, la présence de cet anticorps peut empêcher la formation de la SI, ne démontrant pas clairement le rôle important de la Nrp-1 pour ce processus. Dans des conditions physiologiques normales, lorsque la quantité d'antigène est limitée ou qu'il y a absence de signal de danger, la Nrp-1 favoriserait l'interaction des Tregs avec les DC, empêchant les LT naïfs d'interagir avec les DCs, participant ainsi à l'établissement de la tolérance immunitaire (Sarris, Andersen et al. 2008).

Des travaux récents ont révélé une nouvelle fonction de la Nrp-1 dans le maintien des fonctions des cellules Treg (Delgoffe, Woo et al. 2013). La Sema-4A, exprimée préférentiellement par les cellules immunitaires, peut se lier à la Nrp-1. La liaison de la Sema-4A à la Nrp-1 limite la phosphorylation de la protéine kinase AKT par le recrutement de PTEN via le domaine cytoplasmique de Nrp-1 dans les cellules Treg. Ceci favorise la localisation nucléaire du facteur de transcription

Foxo3a, jouant ainsi un rôle crucial dans la stabilité et les fonctions des cellules Treg. En parallèle, la présence de Treg Nrp-1⁻ au sein de tumeurs, fragilisent eux aussi la stabilité des Treg exprimant la Nrp-1 via une production accrue d'IFN- γ et de molécules de type Th1, optimisant ainsi la réponse antitumorale (Overacre-Delgoffe, Chikina et al. 2017). De plus, la fonction immunosuppressive des Treg exprimant la Nrp-1 serait sous le contrôle de l'IL-10, connue pour être une cytokine immunosuppressive et anti-inflammatoire. La suppression de l'IL-10 atténue considérablement l'activité des Treg Nrp-1⁺, facilitant ainsi le développement de réponses immunitaires de types Th1 et Th17. Il en résulte une production accrue d'IFN- γ et d'IL-17, ainsi qu'une augmentation du nombre de LT CD8⁺ à la tumeur, aboutissant à une réduction de la masse tumorale (Wang, Gao et al. 2016). Par ailleurs, la Nrp-1 en réponse au VEGF agit comme un médiateur clé de l'infiltration des cellules Treg dans les tumeurs, ce qui inhibe la réponse immunitaire antitumorale et conduit à une progression accrue de la tumeur (Hansen, Hutzler et al. 2012). La Nrp-1 par tous ces aspects semble être une cible thérapeutique potentielle prometteuse pour cibler les Tregs dans le traitement de maladies telles que le cancer.

- **La Nrp-1 et LT CD8⁺**

Comparé aux Treg, peu d'informations sont connues sur l'expression et la fonctionnalité de la Nrp-1 dans la population de LT CD8⁺. Chez l'homme, l'engagement *in vitro* du TCR permet l'induction de l'expression de la Nrp-1 à la surface de LT CD8⁺ provenant du sang périphérique (Dzionek, Inagaki et al. 2002; Milpied, Renand et al. 2009). En revanche, une des premières études portant sur la Nrp-1 sur les LT CD8⁺, a montré que celle-ci serait exprimée aussi par les LT CD8⁺ naifs (Tordjman, Lepelletier et al. 2002). Ce résultat doit être pris avec précaution car à l'heure actuelle toutes les études montrent l'importance de l'état d'activation des LT CD8⁺ pour l'expression de la Nrp-1 à leur surface. Récemment il a été montré que la Nrp-1 peut être retrouvée à la surface de LT CD8⁺ infiltrant des tumeurs humaines, de type mélanome métastatique. À l'opposé, aucune expression de la Nrp-1 n'a été retrouvée sur les LT CD8⁺ provenant du sang de ces patients et de donneurs sains, appuyant le fait que l'état d'activation semble primordial pour l'expression de la Nrp-1 (Jackson, Berrien-Elliott et al. 2014). À ce jour, la fonction de la Nrp-1 dans cette population immunitaire reste inconnue, et la régulation de son expression nécessite d'être approfondie.

3.3. Implication de la Nrp-1 dans le cancer

La contribution des Nrps à l'angiogenèse a incité l'étude de leur rôle dans l'oncogenèse. Une expression de la Nrp-1 a été constatée aussi bien sur des cellules endothéliales que sur des tissus tumoraux pour la première fois en 1998 (Soker, Takashima et al. 1998). En effet, l'expression des

Nrps n'est pas limitée aux vaisseaux intra-tumoraux, mais une grande variété de cellules cancéreuses exprime la Nrp-1 à leur surface, suggérant un rôle de ce récepteur dans la progression tumorale. La Nrp-1 est exprimée par une large variété de lignées cellulaires tumorales, incluant celles dérivées de carcinome de la prostate, du rein, de la vessie, du côlon, du pancréas, du sein, et du poumon entre autres (Chaudhary, Khaled et al. 2014). L'expression de la Nrp-1 a également été détectée dans les cellules tumorales d'échantillons de tumeurs de patients ou de biopsies, avec cependant une variation d'expression importante en fonction du type tumoral (Chaudhary, Khaled et al. 2014). L'expression accrue de la Nrp-1 est corrélée avec l'agressivité tumorale, le stade de la maladie ou un mauvais pronostic dans les tumeurs de la prostate, du CBNPC, des ovaires, du côlon et plusieurs organes du tractus gastro-intestinal, ainsi que des gliomes et des ostéosarcomes (Rizzolio and Tamagnone 2011; Zhu, Cai et al. 2014; Lu, Cheng et al. 2015). Les mécanismes d'action précis de la Nrp-1 dans le cancer sont difficiles à cerner. Cependant, la Nrp-1 pourrait contribuer à la prolifération, à la migration, à l'invasion, et à l'adhérence des cellules cancéreuses, ainsi qu'au développement de métastases par son interaction avec les récepteurs PDGFR, TGF- β RI/II/III et c-Met (Prud'homme and Glinka 2012) (**Figure 14**). La Nrp-1 contribuerait aussi à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et au maintien d'un phénotype de cellules souches immatures ou cancéreuses (Grun, Adhikary et al. 2016; Luo, Hou et al. 2016).

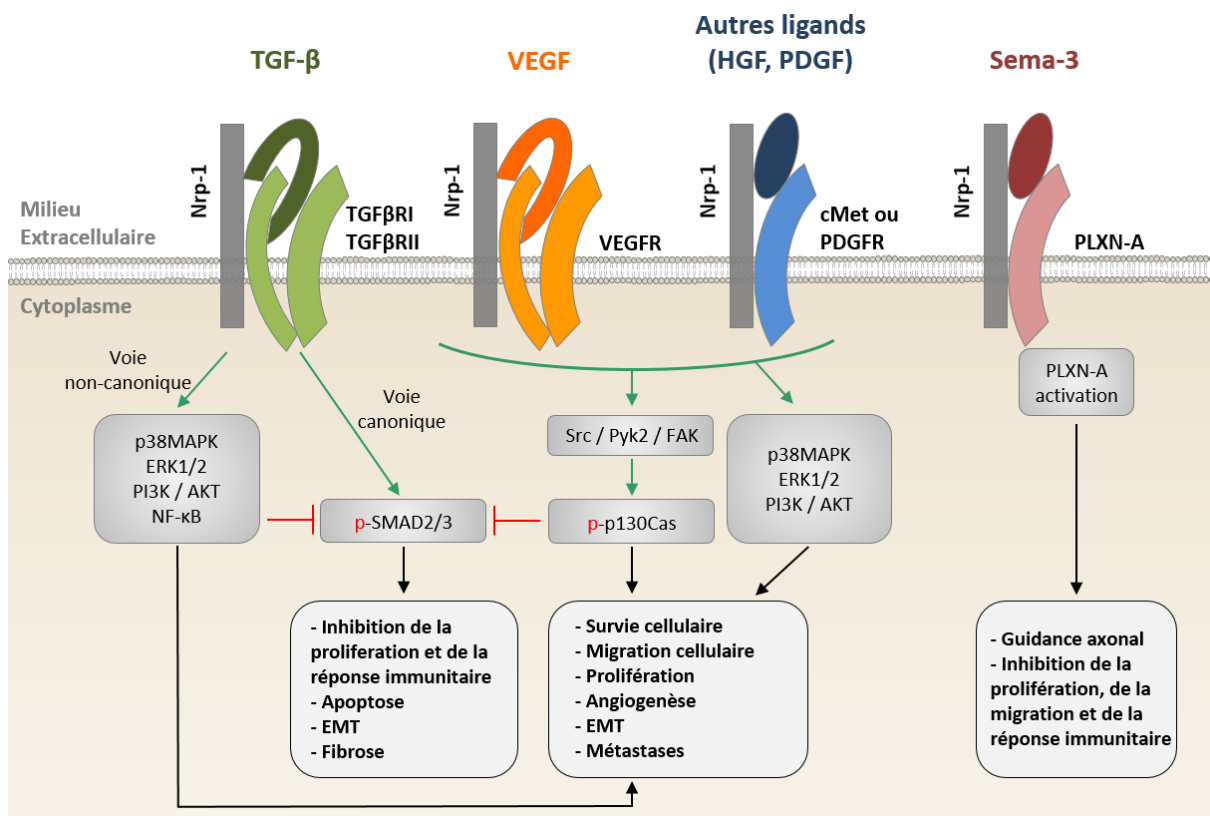


Figure 14 : Les différentes fonctions de la Neuropiline-1 dans le cancer

En parallèle, la Nrp-1 est également exprimée par diverses cellules stromales, comprenant les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires. La Nrp-1 peut ainsi, via d'autres types cellulaires, influencer la progression tumorale. Comme décrit précédemment, la Nrp-1 forme des complexes avec les récepteurs VEGFR, et améliore ainsi la signalisation du VEGF (Herzog, Pellet-Many et al. 2011). Par ce mécanisme, la Nrp-1 peut influencer la vascularisation tumorale et favoriser la néoangiogenèse tumorale. La Nrp-1 permet aussi d'influencer le recrutement et la fonction de cellules immunitaires au site tumoral, modulant ainsi la réponse immunitaire. Le développement du cancer est en partie causé par le déséquilibre entre l'immunité de l'hôte et la tolérance/suppression immunitaire. De multiples voies de suppression sont en jeu dans l'environnement tumoral, comprenant les macrophages, les Tregs, les MDSC et les pDC. Comme décrit précédemment, la Nrp-1 est présente sur les macrophages, les Tregs et les pDC ; elle est donc une molécule candidate pour induire une tolérance immunitaire conduisant au développement et à la progression tumorale. Ainsi le VEGF sécrété par la tumeur est le médiateur du recrutement des nTreg exprimant la Nrp-1, qui pourront alors inhiber la fonctionnalité des LT CD8⁺ soit par contact direct soit par la sécrétion de facteurs inhibiteurs tels que le TGF-β et l'IL-10. De plus, la Nrp-1 permet la migration des macrophages M1 situés dans la région normoxique de la tumeur vers la Sema-3A sécrétée par les cellules tumorales localisées en zone hypoxique. Les macrophages M1 perdent ainsi l'expression de la Nrp-1 à leur surface et se transforment en macrophages de type M2, inhibant ainsi la réponse immunitaire antitumorale (**Figure 15**).

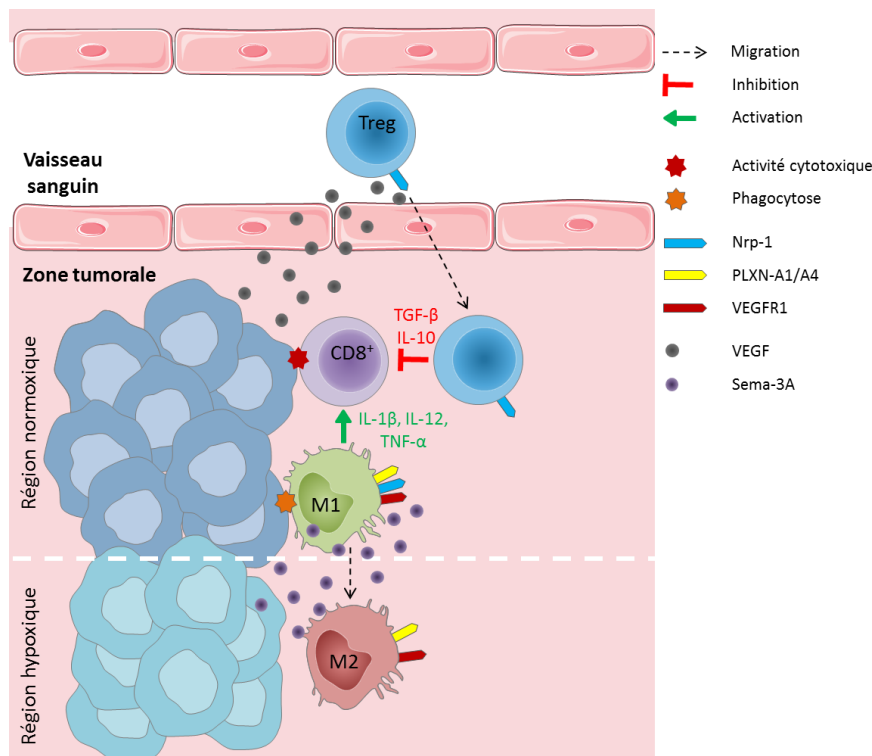


Figure 15 : Rôle de la Neupiline-1 dans l'immunité antitumorale

4. La Nrp-1 comme cible thérapeutique

Compte tenu de la multitude des fonctions exercées par la Nrp-1, elle constitue une cible thérapeutique intéressante. Ainsi, plusieurs stratégies ont été développées pour cibler ce récepteur dans les tumeurs. Cependant, à ce jour aucun médicament ciblant la Nrp-1 n'a été approuvé pour être utilisé en clinique.

4.1. Les Acm anti-Nrp-1

Des Acm bloquant les différents domaines extracellulaire (domaine a1/a2, domaine b1/b2 et le domaine MAM) de la Nrp-1 ont été développés (Liang, Dennis et al. 2007). Par exemple, des Acm anti-Nrp-1 spécifiques au domaine b1/b2, bloquant ainsi l'interaction avec le VEGF-A, sont capables d'inhiber la croissance tumorale (Pan, Chanthery et al. 2007). Un autre Acm anti-Nrp-1 (MNRP1685A) mis au point par Genentech, a fait l'objet d'essais cliniques de phase I, en association avec le bevacizumab et/ou le paclitaxel (Weekes, Beeram et al. 2014). Cependant, l'association de cet anticorps et du bevacizumab ne peut pas être utilisée pour l'instant en clinique, car cette combinaison provoque de très nombreux effets indésirables chez les patients atteints de cancers (Patnaik, LoRusso et al. 2014).

4.2. Cibler les ligands de la Nrp-1

Pour inhiber la fonctionnalité de la Nrp-1, il est possible de cibler ses ligands. Ainsi, plusieurs molécules qui interfèrent avec l'activité des Sema-3, en particulier la Sema-3A, ont été décrites. Par exemple, la xanthofulvine (SM-216289) et la vinaxanthone (SM-345431) inhibent la fonction chimioréulsive de la Sema-3A *in vitro* par interaction directe avec celle-ci (Kikuchi, Kishino et al. 2003; Worzfeld and Offermanns 2014).

Contrairement aux Sema-3, le VEGF-A se lie exclusivement au domaine b1/b2 de la Nrp-1 (Mamluk, Gechtman et al. 2002). Plusieurs peptides ont ainsi été développés pour bloquer spécifiquement cette interaction. Ces peptides sont capables d'inhiber de façon compétitive l'interaction VEGF-A/Nrp-1, et exercent ainsi une activité anti-angiogénique (Jia, Bagherzadeh et al. 2006).

4.3. Utilisation de la forme soluble de la Nrp-1

Les isoformes soluble de la Nrp-1 (sNrp-1) agissent comme leurre et inhibent les fonctions de la Nrp-1 membranaire (Gagnon, Bielenberg et al. 2000; Panigrahy, Adini et al. 2014). L'utilisation de molécules recombinantes de sNrp-1 à des fins thérapeutiques constitue une autre approche intéressante pour bloquer les fonctions de ce récepteur. Par exemple, l'injection d'un adénovirus codant pour la sNrp-1 inhibe significativement la néoangiogénèse et prolonge la survie de souris atteintes de leucémie (Schuch, Machluf et al. 2002). La sNRP-1 diminue également le potentiel invasif et la migration de cellules tumorales *in vitro* (Cackowski, Xu et al. 2004; Hong, Chen et al. 2007).

OBJECTIFS

La compréhension du rôle de la Nrp-1 dans le système immunitaire a nettement progressé ces dernières années. Cependant, peu d'études sur l'expression et la fonction de ce récepteur dans la population des LT CD8⁺ ont été réalisées.

La mission principale des LT CD8⁺ est de détecter les anomalies cellulaires et de protéger l'hôte de l'invasion de pathogènes et de cellules malignes. Néanmoins, il est bien connu maintenant que des facteurs intrinsèques à ces cellules peuvent inhiber leurs fonctions effectrices au sein des tumeurs. Parmi ces facteurs, un défaut de recrutement des LT CD8⁺ au site tumoral ou la transition vers un phénotype épuisé/dysfonctionnel associé à une hausse importante du niveau d'expression de nombreux iRs à leur surface. L'altération de la fonctionnalité des LT CD8⁺ est partiellement régulée par les iRs, tels que PD-1 et CTLA-4, en inhibant les voies d'activation de ces cellules (Freeman, Long et al. 2000; Wherry and Kurachi 2015). Le développement d'anticorps ciblant ces iRs et leur utilisation en immunothérapie a permis d'améliorer la survie des patients dans de nombreux cancers. Malheureusement, seule une fraction des patients répond à ces traitements. Le succès limité de ces approches immunothérapeutiques pourrait être dû à l'expression d'iRs supplémentaires à la surface des LT CD8⁺ et à l'activation sous-optimale de ces cellules dans un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Il est donc crucial de caractériser l'influence d'autres facteurs moléculaires régulant la migration et les activités fonctionnelles des LT CD8⁺ afin d'améliorer les traitements anticancéreux actuels.

Récemment, il a été montré qu'une population de LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs de patients atteints de mélanome métastatique, exprime la Nrp-1 contrairement aux LT CD8⁺ provenant de leur sang périphérique ou de sang de donneurs sains (Jackson, Berrien-Elliott et al. 2014). Cependant, le profil d'expression de la Nrp-1 et une co-expression potentielle avec d'autres iRs, tels que CTLA-4 et PD-1, et/ou le statut dysfonctionnel de ces cellules n'ont pas été étudiés. De plus, l'implication de la Nrp-1 dans la régulation des fonctions effectrices des LT CD8⁺ n'est pas jusqu'ici connue. Néanmoins, il a été montré dans un modèle murin d'infection chronique et de cancer que la Nrp-1 est l'un des gènes les plus régulés positivement dans les LT CD8⁺ épuisés/dysfonctionnels (Wherry, Ha et al. 2007; Schietinger, Philip et al. 2016).

Dans ce contexte les objectifs de mes travaux de thèse sont de :

- 1- Étudier le profil d'expression de la Nrp-1 dans la population de LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs
- 2- Déterminer le rôle de la Nrp-1 dans la population de LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs
- 3- Évaluer l'efficacité d'une immunothérapie combinant un Acm anti-Nrp-1 avec l'Acm anti-PD-1

Pour cela, j'ai utilisé différents modèles d'études (**Figure 16**). Dans un premier temps, les TILs $CD8^+$ provenant de prélèvements tumoraux frais de patients atteints de CBNPC ont été utilisés. Dans un second temps, j'ai développé un modèle *in vivo* de souris C57BL/6 greffées en sous cutanée avec le mélanome B16F10. Les TILs $CD8^+$ provenant de ces tumeurs ont été isolés 15-17 jours après greffe, caractérisés phénotypiquement, et leurs capacités fonctionnelles ont été étudiées.

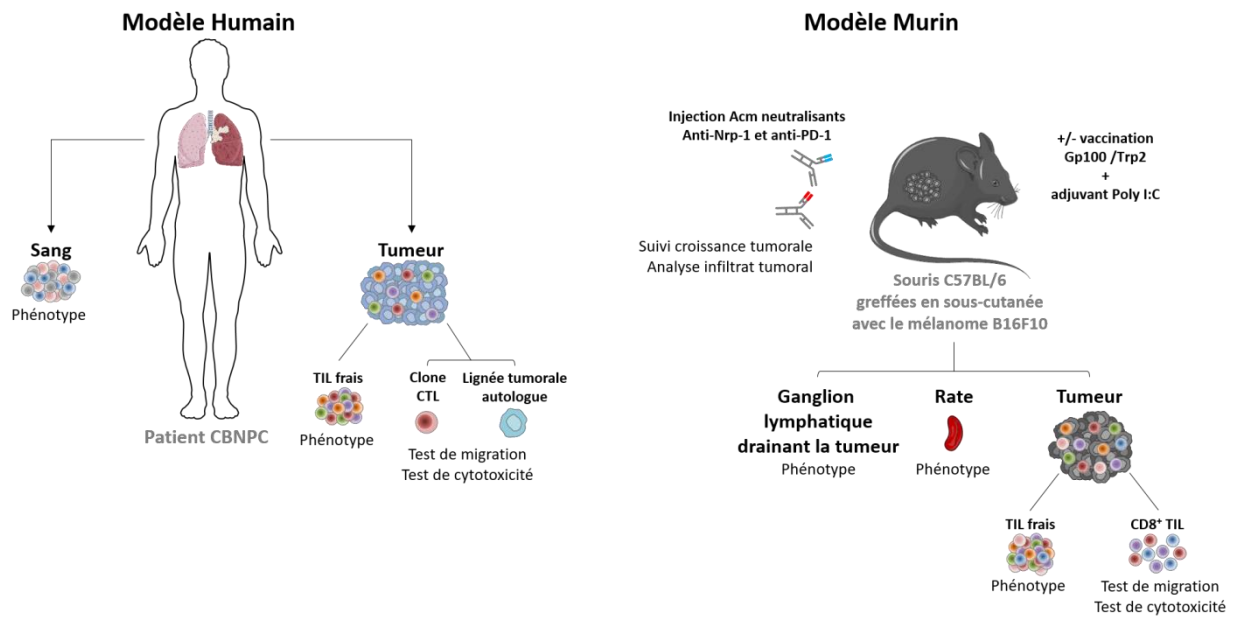


Figure 16 : Modèles expérimentaux

RÉSULTATS

“Neuropilin-1 an immune checkpoint for controlling tumour-specific CD8 T-cell functions whose blockade improves anti-PD-1 therapy”

Marine Leclerc, Elodie Voilin, Gwendoline Gros, Stéphanie Cognac, Vincent de Montpréville, Pierre Validire, Georges Bismuth and Fathia Mami-Chouaib

Soumis pour publication (Novembre 2018)

Résumé :

Nous avons observé, dans des TILs fraîchement isolés de CBNPC, que la Nrp-1 était fréquemment exprimée sur les LT CD8⁺ présentant un phénotype activé/épuisé. De plus, la liaison de la Nrp-1 avec un de ses ligands, la Sema-3A, inhibe la migration de CTLs vers un gradient de la chimiokine CXCL12, ainsi que leur fonction cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales autologues. Des expériences *in vivo* chez des souris C57BL/6 transplantées avec le mélanome B16F10 et immunisées avec le vaccin thérapeutique formé des peptides Trp2 et gp100 ont révélé que l'expression de la Nrp-1 sur les TILs CD8⁺ était corrélée avec celle de PD-1. Cette population de TILs CD8⁺ Nrp-1⁺ PD-1^{hi} exprime aussi fortement les iRs tels que Tim-3, LAG-3 et CTLA-4, et elle est plus enrichie en cellules spécifiques de la tumeur que la population CD8⁺ Nrp-1⁻ PD-1^{hi}. Mes résultats ont montré que le blocage de la Nrp-1 et/ou de PD-1 par des Acm neutralisants augmente l'activité cytotoxique des TILs CD8⁺ vis-à-vis des cellules tumorales autologues *ex vivo*. De plus, seul l'Acm anti-Nrp-1 (ciblant le domaine de fixation des sémaphorines) est capable d'augmenter l'activité migratoire des TILs CD8⁺ Nrp-1⁺ PD-1^{hi} vers les cellules tumorales. De manière plus important, le blocage immunothérapeutique de la Nrp-1 en combinaison avec la neutralisation de PD-1 optimise le contrôle de la croissance tumorale et entraîne une augmentation de l'infiltration tumorale par les LT CD8⁺ présentant un potentiel prolifératif et cytotoxique accru. Ainsi, la Nrp-1 apparaît comme un nouveau iR et une cible prometteuse pour les immunothérapies dans le cancer du poumon et le mélanome.

Neuropilin-1 an immune checkpoint for controlling tumour-specific CD8 T-cell functions whose blockade improves anti-PD-1 therapy

Marine Leclerc¹, Elodie Voilin^{1#}, Gwendoline Gros^{1#}, Stéphanie Cognac¹, Vincent de Montpréville^{1,2}, Pierre Validire³, Georges Bismuth^{4,5,6} and Fathia Mami-Chouaib^{1*}

¹ INSERM UMR 1186, Gustave Roussy, EPHE, PSL, Faculté de Médecine-Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 94805, Villejuif, France

² Centre chirurgical Marie-Lannelongue, Service d'Anatomie Pathologie, 92350, Le-Plessis-Robinson, France

³ Institut Mutualiste Montsouris, Service d'Anatomie pathologique, 75014, Paris, France

⁴ INSERM U1016, Institut Cochin, 75014 Paris, France

⁵ CNRS, Unité mixte de Recherche 8104, 75014 Paris, France

⁶ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France

#Contributed equally to this work.

Running title: Nrp-1 acts as an immune checkpoint in anti-tumour CD8 T-cell immunity

Key-words: CTL, neuropilin-1, immune checkpoint, cancer immunotherapy, CD8⁺ TIL.

Abbreviations: CTL: cytotoxic T lymphocyte; CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen 4; MHC-I: major histocompatibility complex class I; mAb: monoclonal antibody; NSCLC: non-small-cell lung cancer; Nrp-1: neuropilin-1, PD-1: programmed cell death-1; qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction; r: recombinant; Sema: semaphorin; TCR: T-cell receptor; TIL: tumour-infiltrating T lymphocyte; Treg: regulatory T.

Abstract

Neuropilin-1 (Nrp-1) has been defined as a marker of murine CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells and a subset of human CD4⁺ Treg cells. It is also expressed by a population of CD8⁺ T cells infiltrating some solid tumours. However, little is known about its contribution to regulation of tumour-specific CD8 T-cell functions. Here we show that Nrp-1 defines a subset of CD8⁺ T cells displaying PD-1^{high} (PD-1^{hi}) status and infiltrating human non-small cell lung cancer (NSCLC). Using a human cytotoxic T lymphocyte (CTL) clone model, we show that the interaction of Nrp-1 with its ligand semaphorin-3A, secreted by autologous NSCLC cells, inhibits both CTL migration and tumour-specific lytic function. *In vivo* experiments revealed that this Nrp-1⁺PD-1^{hi} CD8⁺ tumour-infiltrating T lymphocyte (TIL) subset is also found in engrafted B16F10 mouse melanoma, and is enriched with tumour-specific T cells exhibiting an exhausted state, with co-expression of Tim-3, LAG-3 and CTLA-4 inhibitory receptors. Functionally, anti-Nrp-1 neutralizing antibodies increase the migratory capacity of Nrp-1⁺PD-1^{hi} CD8⁺ TIL toward autologous cancer cells and enhance their specific cytotoxic activity *ex vivo*. Remarkably, *in vivo* immunotherapeutic blockade of Nrp-1 results in control of tumour growth, with a parallel increase in tumour infiltration by CD8⁺ TIL and enhanced proliferative and cytotoxic potential. This blockade is cumulative with anti-PD-1 treatment in improving tumour regression. Thus, Nrp-1 appears to be a novel immune checkpoint target on CD8⁺ tumour-specific T cells for combined antibody-based cancer immunotherapies.

Introduction

Cytotoxic T lymphocytes (CTL), predominantly expressing T-cell co-receptor CD8, play a major role in the anti-tumour immune response. To destroy malignant cells, CTL must first migrate to the tumour site, infiltrate tumour cell clusters, and then interact with malignant cells to achieve their cytotoxic functions after T-cell receptor (TCR) recognition of specific tumour peptide-major histocompatibility complex class I (MHC-I) complexes on target cells¹. To perform this killing function, activated CTL are armed with various effector molecules, including pro-inflammatory cytokines, in particular IFN γ and TNF α , and cytotoxic granules containing perforin and granzymes. However, cancer cells frequently escape CD8 T-cell recognition and reactivity. A decrease in cell surface expression of peptide/MHC-I complexes on cancer cells is one mechanism involved in this lack of functional activity. However, it now appears clear that engagement of inhibitory receptors such as CTLA-4, PD-1 and Tim-3, expressed on CD8⁺ tumour-infiltrating T lymphocytes (TIL) with their respective ligands on target cells, is another critical constraint explaining the poor reactivity of these cells in the tumour immune context². Moreover, PD-1 expression on CD8⁺ TIL appears to be a characteristic of clonally expanded CD8⁺ tumour-reactive T cells identified in cancer patients³.

In this context, elucidating the mechanisms of CTLA-4 and PD-1 T-cell inhibitory signalling has led to development of promising cancer immunotherapy tools, including blocking monoclonal antibodies (mAb) targeting these so-called “immune checkpoints”^{4, 5}. Yet, to be efficient, immune checkpoint blockade therapies require strong tumour infiltration by CTL whose activities are subjected to such inhibition. Indeed, the therapeutic benefit of the PD-1 blockade requires that tumours be infiltrated by CD8⁺ TIL strongly expressing the PD-1 receptor⁶. Under these conditions, CD8⁺ T-cell responses to tumour-specific antigens parallel tumour regression, and appear to be directly associated with clinical benefits of anti-PD-1

immunotherapy^{3,7}. Unfortunately, only a fraction of cancer patients respond to PD-1 blockade and, among long-term responders, relapses are often observed after initial tumour regression. In this regard, a high proportion of tumours, referred to as « immune deserts » or « cold tumours », are not infiltrated by immune cells and are thus poorly responsive to immunotherapy. Moreover, additional as yet undescribed inhibitory mechanisms inherent to CD8⁺ TIL and leading to tumour resistance likely exist.

In this light, we aimed to analyse the role of neuropilin-1 (Nrp-1) during anti-tumour CD8⁺ T-cell responses. Nrp-1 acts as a co-receptor for extracellular ligands, including secreted members of the class 3 semaphorin (Sema-3) family, isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor (TGF) β ⁸. This transmembrane glycoprotein is involved in axon guidance and neuronal development^{9,10}. More recently, a growing body of evidence suggests that Nrp-1 plays multiple roles in the immune system and in T-cell responses. In mice, Nrp-1 is expressed at high levels on natural regulatory T (nTreg) cells, and its expression by Treg cells is responsible for reduced anti-tumour immunity^{11,12}. Nrp-1 deficiency on murine Foxp-3⁺ CD4⁺ Treg cells has been reported to delay tumour growth correlated with enhanced activation of tumour-infiltrating CD8⁺ T cells¹³. In humans, Nrp-1 is also expressed on a subset of CD4⁺ Treg cells in lymph nodes¹⁴ and on CD4⁺ TIL, including suppressive Treg¹⁵. However, much less is known about the expression of Nrp-1 on CD8⁺ TIL and its involvement in regulating their functions. Nrp-1 has been found to be expressed by murine-tolerant self-reactive CD8⁺ T cells, and by both mouse and human melanoma-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes¹⁶. Nevertheless, expression of Nrp-1 on CD8⁺ TIL has not been thus far systematically addressed, and its potential role in inhibiting anti-tumour T-cell functions is unknown.

In the present study, we report that Nrp-1 is expressed on a subset of human CD8⁺ TIL in non-small-cell lung cancer (NSCLC) tumours and on murine CD8⁺ TIL from B16F10 melanoma. These T lymphocytes also express high levels of PD-1, defining a new subset of Nrp-1⁺PD-1^{hi} TIL enriched with tumour-specific T cells and displaying an exhausted state. Importantly, we show that the interaction of human Nrp-1 with its ligand Sema-3A inhibits T-cell migration and tumour-specific TCR-mediated cytotoxic functions *in vitro*. In contrast, anti-Nrp-1 neutralizing antibodies increase the migratory capacity of Nrp⁺PD-1^{hi} CD8⁺ TIL toward autologous cancer cells and enhance their specific cytotoxic activity *ex vivo*. In addition, we show here that anti-Nrp-1 blocking mAb restore CD8⁺ T-cell effector functions and optimize control of tumour growth induced by anti-PD-1 *in vivo*. We conclude that Nrp-1 negatively regulates anti-tumour CD8⁺ T-cell immunity and is thus a promising target for combined cancer immunotherapies.

Results

Nrp-1 is expressed on a subset of CD8⁺ T lymphocytes infiltrating human lung tumours

Nrp-1 is expressed on CD4⁺ Treg cells in human lymph nodes and in TIL from colorectal cancer metastases^{14, 15}. However, little is known about its expression on CD8⁺ TIL. Therefore, we first evaluated the expression of *NRPI* transcripts in primary human lung tumours and autologous normal lungs. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) showed high expression levels of *NRPI* mRNA in some lung tumour samples compared to the cognate normal lung (Supplementary Fig. 1a). Moreover, freshly isolated lung TIL were found to express *NRPI* mRNA (data not shown). Human NSCLC were also found to express *NRP2* and certain Plexin (Plxn) A or D family member transcripts, as well as genes encoding Nrp ligands of the Sema 3 family (Supplementary Fig. 1). We next evaluated the expression of Nrp-1 protein in freshly isolated TIL from 28 NSCLC tumours. Immunofluorescence analyses showed that Nrp-1 was expressed on a subset of human lung CD3⁺ TIL. In contrast, parallel analysis of peripheral blood lymphocytes (PBL) from lung cancer patients and healthy donors (HD) showed that circulating T cells did not express the receptor (Fig. 1a). Expression of Nrp-1 was observed on both CD8⁺ and CD4⁺ TIL, but with a higher frequency on CD8⁺ TIL. Moreover, expression of Nrp-1 correlated with the activation state of T lymphocytes, since it was more frequent on CD25⁺ and PD-1⁺ T cells from both CD8⁺ and CD4⁺ TIL subsets than on CD25⁻ and PD-1⁻ subsets (Fig. 1b and c). Indeed, 70.1 ± 8.3 % of Nrp-1⁺ CD8⁺ TIL and 76.9 ± 4.2 % of Nrp-1⁺ CD4⁺ TIL also expressed high levels of PD-1 (PD-1^{hi}). Consistently, activation of HD PBL with immobilized anti-CD3 mAb induced expression of the protein (Supplementary Fig. 2a and b). In contrast, no correlation between Nrp-1 and Foxp3 expression was observed in CD4⁺ TIL, since equal percentages of Nrp-1⁺ T cells were found in both Foxp3⁺ and Foxp3⁻ subsets, which showed similar percentages of PD-1^{hi} cells (Fig. 1d). These results show that Nrp-1 is expressed on a subset of activated human CD4⁺ and CD8⁺ TIL displaying PD-1^{hi}

status in NSCLC tumours.

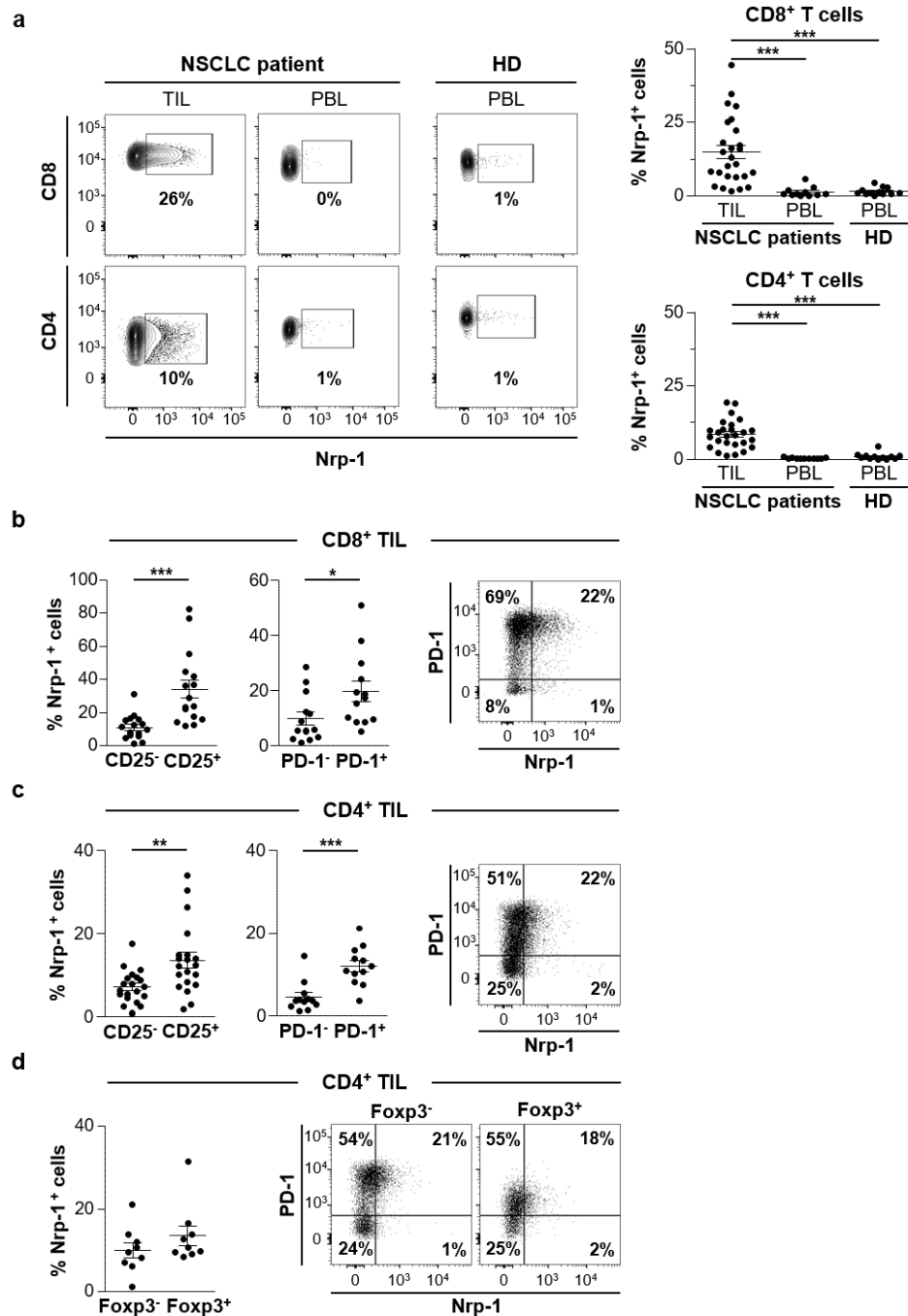


Figure 1 - Expression of Nrp-1 and PD-1 on T cells infiltrating human NSCLC tumours.

a. Surface expression of Nrp-1 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells from TIL and PBL. TIL from freshly resected NSCLC tumours were isolated and then directly analysed by flow cytometry for Nrp-1 expression on CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ lymphocytes. Expression of Nrp-1 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HD and NSCLC patient's PBL was evaluated. Percentages of positive cells are indicated. Right: percentages of Nrp-1⁺ CD8⁺ and Nrp-1⁺ CD4⁺ T cells in TIL (n=28) and PBL from HD (n=12) and NSCLC patients (n=11). **b.** Expression of CD25 and PD-1 on Nrp-1⁺ CD8⁺ T cells from NSCLC TIL. Percentages of Nrp-1⁺ T cells among CD8⁺ TIL expressing or not CD25 or PD-1 (n=13-to-16). Right: dot plot showing co-expression of Nrp-1 and PD-1 on CD8⁺ TIL from one representative patient. **c.** Expression of CD25 and PD-1 on Nrp-1⁺CD4⁺ T cells from NSCLC TIL. Percentages of Nrp-1⁺ T cells among CD4⁺ TIL expressing or not CD25 or PD-1 (n=9-to-20). Right: dot plot showing co-expression of Nrp-1 and PD-1 on CD4⁺ TIL from one representative patient. **d.** Expression of Foxp3 in Nrp-1⁺ CD4⁺ T cells. Percentages of Nrp-1⁺ T cells among CD4⁺ TIL expressing or not Foxp3. Right: dot plot for co-expression of Nrp-1 and PD-1 on CD4⁺ TIL expressing or not Foxp3 from one representative patient. Data presented as mean ± SEM. * p<0.05; ** p<0.01 and *** p<0.001.

Interaction of human Nrp-1 with Sema-3A impairs T-cell effector functions *in vitro*

Sema-3A, a secreted member of the Sema-3 family, is a well-known ligand of Nrp-1^{9, 10}. As human CD8⁺ TIL expressed substantial amounts of Nrp-1, this raises the question as to whether its interaction with Sema-3A contributes to the T-cell dysfunction often observed in the tumour microenvironment. To evaluate this hypothesis, we first used the IGR-Pub lung adenocarcinoma cell line and autologous CTL clone P62 established from TIL of a NSCLC patient¹⁷. Initial studies indicated that the IGR-Pub cell line, as well as several other human lung cancer cell lines, and to a lesser extent, normal bronchial epithelial cell line 16HBE, produced Sema-3A, as detected by western blot (Fig. 2a) and intracellular immunofluorescence staining (Supplementary Fig. 2c). In contrast, the P62 T-cell clone did not constitutively express Nrp-1. However, stimulation with plastic-coated anti-CD3 mAb induced strong Nrp-1 expression on the surface of P62 T cells, most of which also expressed IL-2 receptor subunit CD25 and inhibitory receptor PD-1 (Fig. 2b). Therefore, we used the anti-CD3-stimulated P62 CTL clone to examine the consequences of Sema-3A ligation to Nrp-1 on the migratory behaviour and cytotoxic activity of these T lymphocytes *in vitro*.

Previous immunofluorescence experiments indicated that P62 CTL bound rSema-3A-Fc (Fig. 2c) and expressed CXCL12 receptor CXCR4 (Supplementary Fig. 2d). Consequently, P62 T cells were able to migrate toward a gradient of rCXCL12 chemokine in *in vitro* transwell assays (Fig. 2c). We found that this T-cell migratory response was inhibited in the presence of rSema-3A-Fc (Fig. 2d). This impaired T-cell migration was correlated with inhibition by rSema-3A-Fc of the cytotoxic activity of the P62 CTL clone toward autologous IGR-Pub target cells (Fig. 2e). These results indicate that Nrp-1 triggering by its soluble ligand of the Sema-3 family Sema-3A negatively regulates effector functions of Nrp-1⁺ cytotoxic T cells, and suggest a T-cell inhibitory receptor function for Nrp-1.

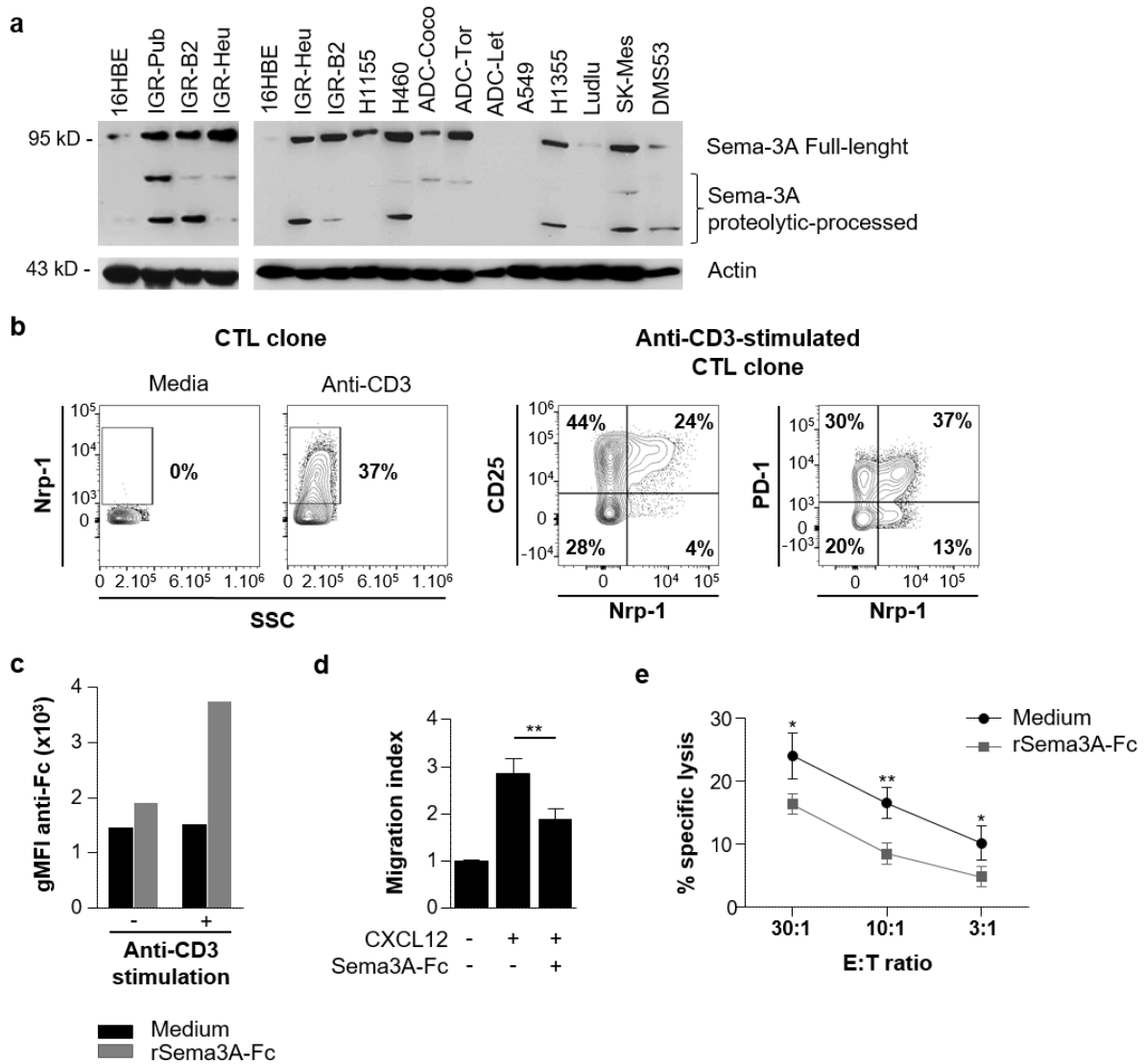


Figure 2 - Expression of Sema-3A and Nrp-1 in human lung tumour cell lines and CTL clone.

a. Sema-3A protein expression in human lung tumour cell lines. Total protein extracts from lung tumour cell lines were analysed by western blot using anti-Sema-3A mAb. The bronchial epithelial cell line 16HBE was included as a control. Full length and proteolytically processed proteins are indicated. Anti-F-actin was included as a loading control. **b.** Expression of Nrp-1 on the P62 CTL clone unstimulated and stimulated with anti-CD3 mAb. Right: Co-expression of Nrp-1 and CD25, and Nrp-1 and PD-1 on P62 T cells stimulated with immobilized anti-CD3. **c.** Sema-3A-Fc binds to Nrp-1 on the P62 CTL clone surface. The P62 T-cell clone was unstimulated or stimulated with anti-CD3 for 48 h, pre-incubated for 30 min with Sema-3A-Fc (12µg/mL), and then labelled with mouse anti-human IgG Fc fragment secondary mAb. **d.** Sema-3A-Fc inhibits CTL clone migration toward a CXCL12 gradient. The P62 T-cell clone was stimulated with anti-CD3 for 48 h, pre-incubated for 30 min with BSA or Sema-3A-Fc, and then seeded in the upper chambers of transwell plates and exposed to a gradient of CXCL12 chemokine loaded in the lower chambers. The number of T cells that had migrated into the lower chambers was determined. Results are represented as mean chemotaxis index \pm SD of triplicate samples. **e.** Cytotoxic activity of the CTL clone toward autologous tumour cells. The P62 T-cell clone was stimulated with plastic-coated anti-CD3 for 48 h, left in media for 24 h to detach anti-CD3 mAb and then pre-incubated in medium or with Sema-3A-Fc. Cytotoxicity toward the cognate IGR-Pub tumour cell line was determined by a conventional 4 h ⁵¹Cr release assay at indicated E:T ratios. Data shown correspond to one of 3 independent experiments. * p<0.05; ** p<0.01.

Nrp-1⁺ CD8⁺ T cells infiltrating murine B16F10 melanoma display an exhausted PD-1^{hi} state

To investigate the impact of Nrp-1 engagement with its ligand on CD8⁺ TIL functions *in vivo*, we used C57BL/6 mice engrafted with B16F10 melanoma cells, which express the Nrp-1 soluble ligand Sema-3B, as shown by RT-PCR analyses (Supplementary Fig. 3a) and confirmed by western blot (Fig. 3a). At day 15, tumours were removed and TIL were isolated and analysed by flow cytometry. T cells from spleens and tumour-draining lymph nodes (TdLN) of the same mice were examined in parallel for Nrp-1 expression. Results showed that a large fraction of CD8⁺ TIL expressed Nrp-1 ($45.5\% \pm 2.5$), as opposed to spleens ($1.9\% \pm 0.4$) and TdLN ($1.3\% \pm 0.1$). The frequency of Nrp-1⁺ T cells was also higher in CD4⁺ TIL ($37.7\% \pm 2.6$), compared to spleens ($15.7\% \pm 0.8$) and TdLN ($12\% \pm 0.4$) (Fig. 3b). Moreover, while most Nrp-1⁺ CD4⁺ cells from spleens ($80.5\% \pm 1.2$) and TdLN ($73\% \pm 2.7$) expressed the Treg cell marker Foxp3, Nrp-1⁺ CD4⁺ TIL included both Foxp3⁺ ($54.2\% \pm 1.7$) and Foxp3⁻ ($27.2\% \pm 2.2$) T cells (Fig. 3c). It should be noted that most, if not all, CD8⁺ TIL displayed a CD44^{high}CD62L^{low} phenotype, characteristic of effector/memory T (T_{EM}) cells, especially when they co-expressed Nrp-1 (Fig. 3d). Notably, as in humans, expression of Nrp-1 was dependent on the activation state of T cells, since stimulation of CD3⁺CD8⁺ mouse splenocytes with immobilized anti-CD3 induced Nrp-1 expression, which reached a plateau at 72 h (Supplementary Fig. 3b) and was inhibited with the NFAT inhibitor 11R-VIVIT, indicating that the TCR signalling pathway was likely involved (Supplementary Fig. 3c).

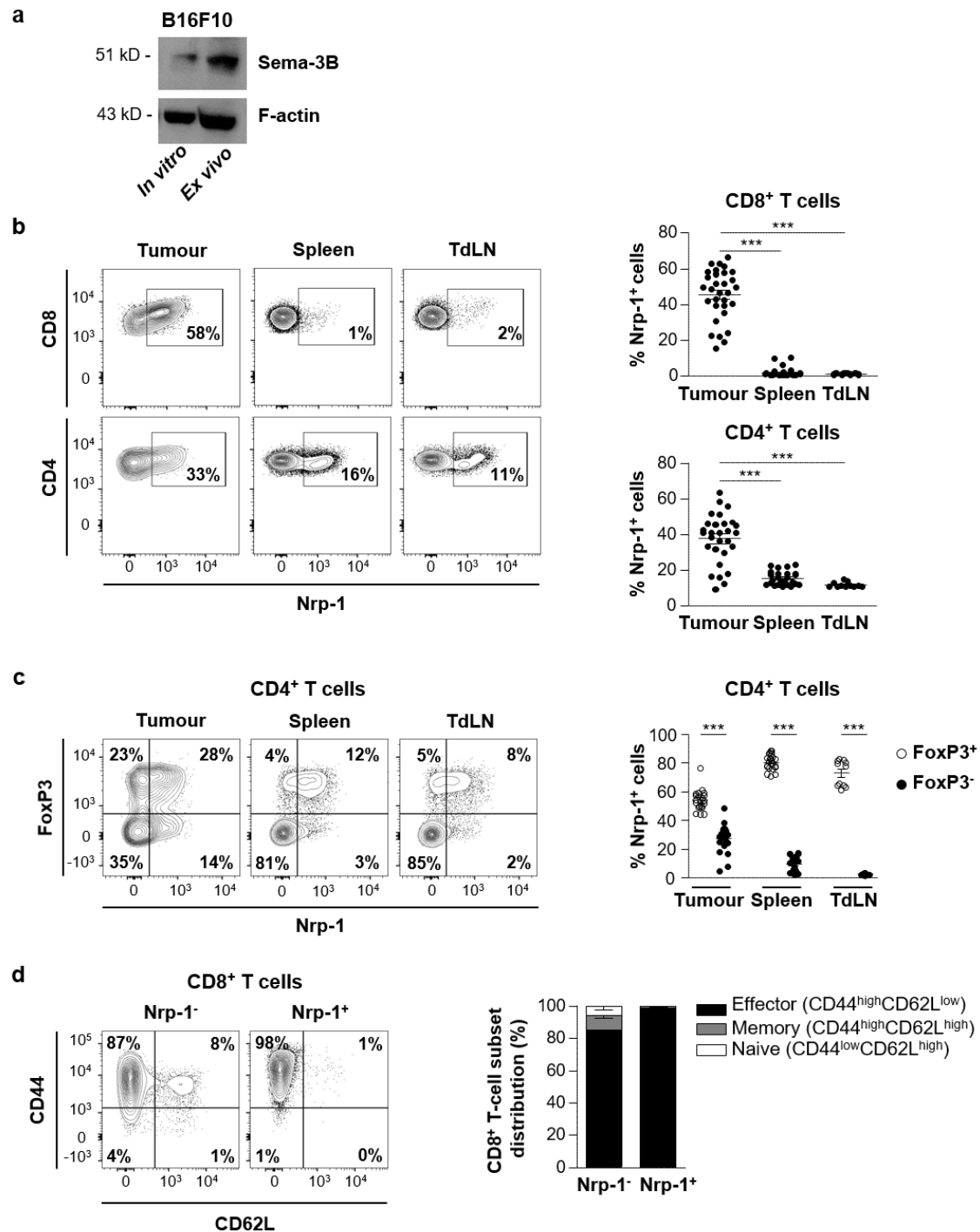


Figure 3 - Expression of Sema-3B and Nrp-1 in B16F10 mouse melanoma model.

a. Expression of Sema-3B in B16F10 tumour cells. Total protein extracts from B16F10 tumour cells cultured *in vitro* or isolated *ex vivo* from tumour grafts were analysed by western blot using anti-Sema-3B mAb. Anti-F-actin was included as a loading control. **b.** Surface expression of Nrp-1 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells infiltrating B16F10 melanoma engrafted in C57BL/6 mice. TIL from individual tumours were isolated at day 15 after tumour cell inoculation using CD45 beads, and then labelled with anti-Nrp-1, -CD3, -CD4 and -CD8 mAb. T lymphocytes from spleens and TdLN of tumour-bearing mice were analysed in parallel. Percentages of positive cells are included. Right: percentages of Nrp-1⁺ cells among CD8⁺ and CD4⁺ T cells in TIL (n=30) and splenocytes and TdLN (n=16-to-30). **c.** Expression of Nrp-1 and Foxp3 in CD4⁺ T cells. T lymphocytes from tumours, spleens and TdLN of B16F10 melanoma-bearing C57BL/6 mice were analysed at day 15 by flow cytometry. Right: Percentages of Nrp-1⁺ cells among Foxp3⁺ and Foxp3⁻ CD4⁺ T lymphocytes from B16F10 (n=11-to-20). **d.** Expression of CD44 and CD62L on Nrp-1⁺ and Nrp-1⁻ CD8⁺ T cells from B16F10 TIL. Right: Distribution of Nrp-1⁺ cells among CD8⁺ TIL subpopulations among naive, effector and memory T cells (n=10). Results are representative of 3-5 independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM. *** p<0.001.

We then focused on induction of Nrp-1 on CD8⁺ TIL during tumour progression. Expression of well-known inhibitory receptors PD-1, CTLA-4, Tim-3 and LAG-3 was monitored in parallel. Kinetic studies revealed that the percentage of Nrp-1⁺ CD8⁺ TIL increased during tumour growth, with similar induction of PD-1, LAG-3 and Tim-3 and, to a lesser extent, CTLA-4 (Supplementary Fig. 3d). The absolute number of T cells (*i.e.* the number of TIL per mg of tumour) co-expressing these inhibitory receptors also increased during melanoma progression, and reached a peak at day 14 after tumour implantation (Supplementary Fig. 3e). Remarkably, at day 14, all Nrp-1⁺ CD8⁺ TIL also expressed PD-1, LAG-3, Tim-3 and CTLA-4 on most of them (Fig. 4a). This Nrp-1⁺ T-cell subset displayed a PD-1^{hi} profile (Fig. 4a), with a strong correlation between expressions of the two cell surface molecules (Fig. 4b). Heat map analyses showed that this Nrp-1⁺PD-1^{hi} TIL subset included much higher percentages of T cells expressing other T-cell inhibitory receptors than the Nrp-1⁺PD-1⁺ and Nrp-1⁺PD-1⁻ subsets (Fig. 4c), with a much higher PD-1 geometric mean of fluorescence intensity (gMFI) than the Nrp-1⁺PD-1⁺ subset (Fig. 4d). They also indicated that the Nrp-1⁺PD-1^{hi} TIL subset included higher percentages of T cells expressing granzyme B and proliferation marker Ki-67, as well as exhaustion-associated transcription factors NFATc1, IRF-4, Helios, Blimp-1 and T-bet, compared to the Nrp-1⁺PD-1⁺ subset (Fig. 4c). Nrp-1⁺PD-1^{hi} T cells also expressed high levels of *Batf*, *Cd244* and *Tigit* transcripts, the products of which were associated with dysfunctional T-cell status, but not *Egr2* mRNA (Supplementary Fig. 3f)¹⁸. It should be noted that most Nrp-1⁺Foxp3⁻ CD4⁺ T cells were also found to express PD-1, Tim-3 and CTLA-4, as well as Ki-67 (Supplementary Fig. 3g and h). These results indicate that Nrp-1 characterises a highly activated intratumoral CD8⁺ T-cell subset displaying PD-1^{hi} status and expressing several T-cell inhibitory receptors involved in immune suppression during cancer diseases.

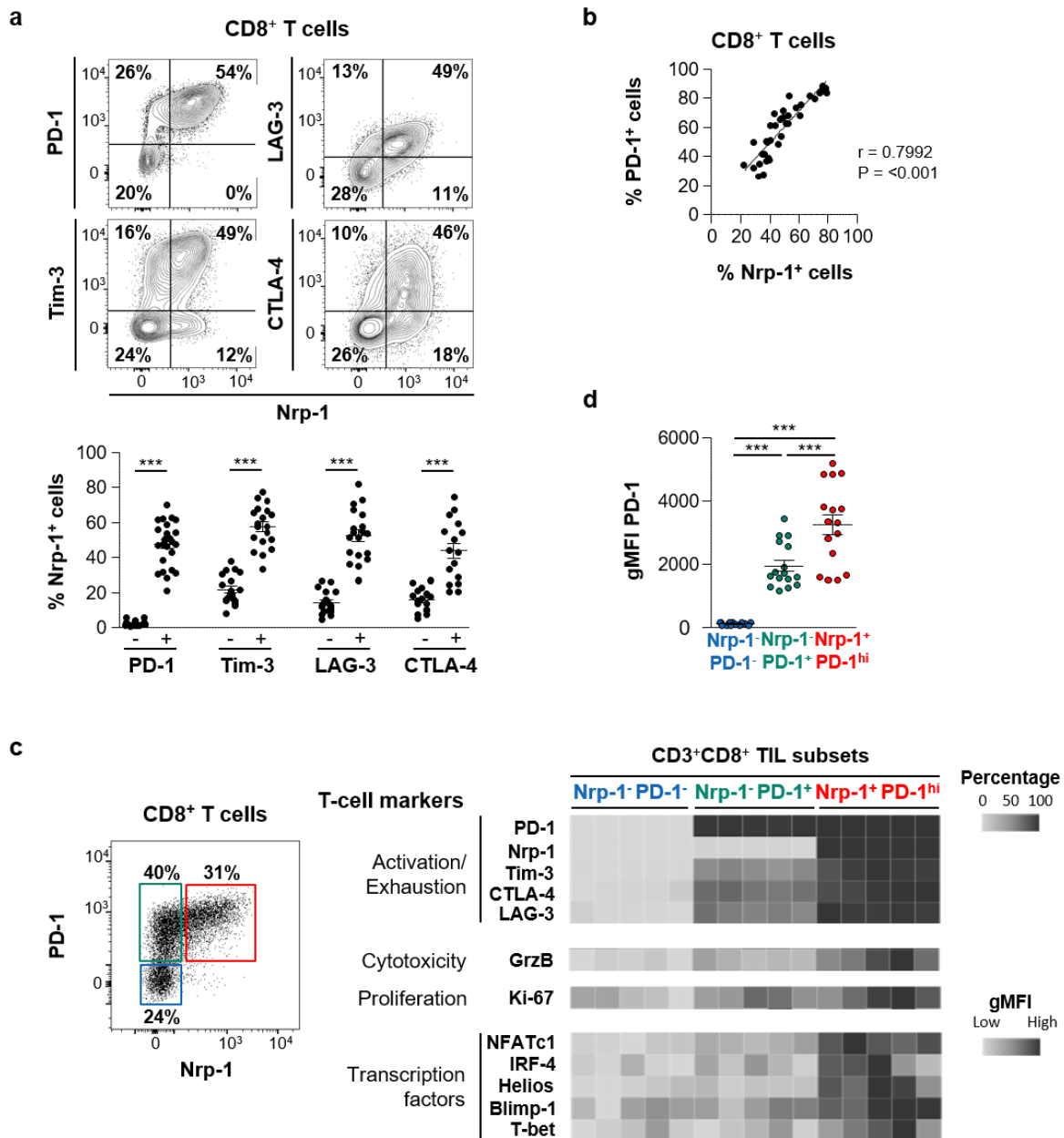


Figure 4 - Expression of T-cell activation/exhaustion markers on the CD8⁺ TIL surface.

a. Expression of Nrp-1, PD-1, LAG-3, CTLA-4 and Tim-3 on CD8⁺ T cells from B16F10 TIL isolated at day 15. Right: percentages of Nrp-1⁺ T cells among CD8⁺ T cells expressing or not PD-1, Tim-3, LAG-3 or CTLA-4 (n=16-to-24). Data are means \pm SEM. *** p<0.001. **b.** Expression of Nrp-1 on CD8⁺ T cells correlated with that of PD-1. **c.** Expression of Nrp-1 on CD8⁺ TIL is restricted to a PD-1^{hi} T-cell population. Expression of Nrp-1 and PD-1 on CD8⁺ TIL; identification of three T-cell subsets: Nrp-1⁺PD-1^{hi}, Nrp-1⁺PD-1⁺ and Nrp-1⁺PD-1⁻. Right: Expression of exhaustion/activation markers, functional proteins and transcription factors in Nrp-1⁺PD-1^{hi}, Nrp-1⁺PD-1⁺ and Nrp-1⁺PD-1⁻ CD8⁺ T-cell subsets. Right panel: Heat maps including percentages of cells positive for expression of PD-1, Nrp-1, Tim-3, CTLA-4, LAG-3, granzyme B (GrzB) and Ki-67, and gMFI for NFATc1, IRF-4, Helios, Blimp-1 and T-bet. **d.** gMFI of PD-1 expression on Nrp-1⁺PD-1^{hi}, Nrp-1⁺PD-1⁺ and Nrp-1⁺PD-1⁻ TIL subsets. Results are representative of 3 to 5 independent experiments.

Nrp-1 typifies a highly activated tumour-specific CD8⁺ TIL subset with impaired functional activities

Next, we investigated the specificity and functionality of these Nrp-1⁺PD-1^{hi} T cells. We first examined whether these lymphocytes were enriched with T cells specific to melanoma-associated antigens (MAA). To do so, C57BL/6 mice engrafted with B16F10 melanoma cells were vaccinated with Trp2 plus gp100 antigenic peptides, together with the poly(I:C) adjuvant. Antigenic specificity of intratumoral CD8⁺ TIL was then analysed with H-2K^b-Trp2 and H-2D^b-gp100 dextramers. Expression of Nrp-1 and PD-1 molecules on these TIL subpopulations was also monitored. Initial experiments showed that vaccinated mice more efficiently controlled tumour growth than unvaccinated mice (Supplementary Fig. 4a). Moreover, at day 14 after melanoma cell transplantation, tumours from vaccinated mice showed increased absolute numbers of CD8⁺ TIL expressing PD-1, Nrp-1 and Tim-3 and, to a lesser extent, CTLA-4 and LAG-3 (Supplementary Fig. 4b). More importantly, the percentage of Trp2-specific and gp100-specific CD8⁺ TIL in the Nrp-1⁺PD-1^{hi} T-cell subset was over two-fold higher ($8.8\% \pm 1.6$ and $10.4\% \pm 2.6$, respectively) than in Nrp-1⁻PD-1⁺ ($2.9\% \pm 0.7$ and $5.6\% \pm 1.2$, respectively) TIL (Fig. 5a). In contrast, the Nrp-1⁻PD-1⁻ TIL subset showed very low percentages of MAA-specific T cells ($0.9\% \pm 0.3$ and $0.5\% \pm 0.3$, respectively). Our results also revealed that *ex vivo* stimulation of Nrp-1⁺PD-1^{hi} TIL with autologous tumour cells induced higher percentages of IFN γ -producing T cells than in Nrp-1⁻PD-1⁻ and the Nrp-1⁻PD-1⁺ TIL subsets (Fig. 5b). Much stronger production of TNF α was also found with Nrp-1⁺PD-1^{hi} CD8⁺ TIL compared to Nrp-1⁻PD-1⁻ T cells, but in this case, percentages of TNF α -producing T cells remained lower than in the Nrp-1⁻PD-1⁺ TIL population. This could be explained by a more advanced exhaustion stage of the Nrp-1⁺PD-1^{hi} CD8⁺ TIL subset than the Nrp-1⁻PD-1⁺ TIL subset as previously suggested during chronic viral infection¹⁹. We then further assessed tumour-reactivity of Nrp-1⁺PD-1^{hi} and Nrp-1⁻PD-1⁺ TIL by measuring

CD107a surface expression, a marker usually used to evaluate the degranulation capacity of CTL. Our results showed that *ex vivo* stimulation of TIL with the cognate B16F10 cell line induced much higher percentages of CD107a⁺ cells among Nrp-1⁺PD-1^{hi} and Nrp-1⁺PD-1⁺ TIL populations than did the Nrp-1⁻PD-1⁻ T-cell subset (Fig. 5c).

Next, we analysed the cytotoxic activity of CD8⁺ TIL toward autologous melanoma cells in the absence or presence of neutralizing anti-Nrp-1 and/or anti-PD-1 mAb, with an isotype-matched mAb as negative control. A 4 h chromium (Cr⁵¹) release assay revealed that CD8⁺ TIL were poorly effective in killing B16F10 tumour cells, whether blocking mAb were present or not (Fig. 5d). In contrast, in a 12 h cytotoxicity assay, anti-Nrp-1 mAb, anti-PD-1 mAb, or a combination of both, strongly increased T-cell-mediated lysis. Notably, a combination of anti-Nrp-1 plus anti-PD-1 did not further increase target cell killing, suggesting that cytotoxicity is mainly mediated by the Nrp-1⁺PD-1^{hi} TIL subset that includes most tumour-specific effector T cells (Fig. 5d). This cytotoxicity was correlated with upregulation of MHC-I molecules on the tumour cell surface (Fig. 5e). Indeed, parallel experiments in which we monitored H2-K^b and H2-D^b expression, as well as PD-L1, on B16F10 cells co-cultured for 12 h with CD8⁺ TIL, showed increase of the three molecule expression, a phenomenon in which IFN γ secreted by T cells was likely involved. Consistently, we observed such an upregulation of H2-K^b/D^b surface expression after 12 h of stimulation of tumour cells with rIFN γ , and on melanoma cells collected from *in vivo* tumour grafts (Supplementary Fig. 4c).

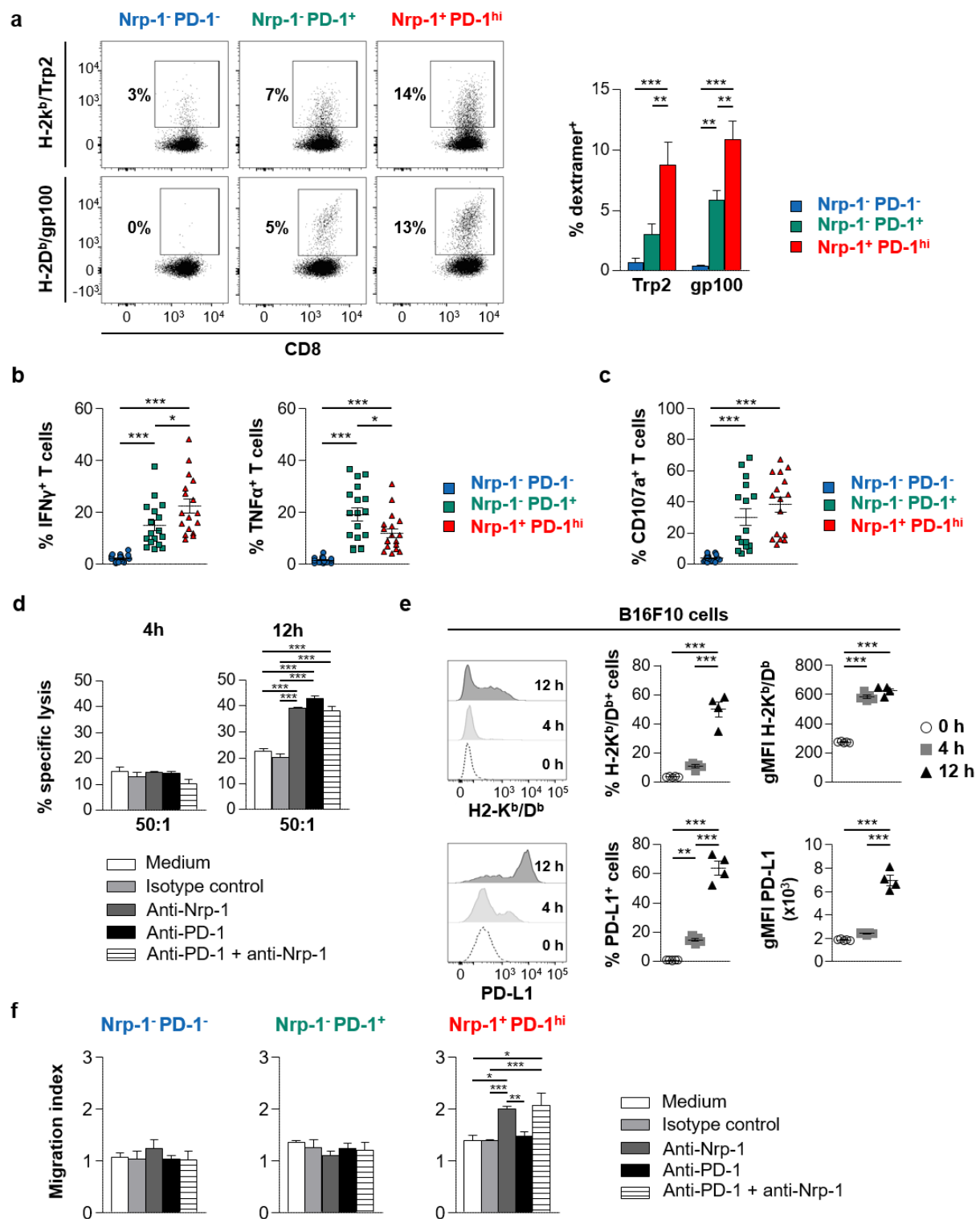


Figure 5 - The Nrp-1⁺PD-1^{hi} TIL subset is enriched with activated antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes.
a. Staining of CD8⁺ TIL with Trp2 and gp100 dextramers. C57BL/6 mice were engrafted with B16F10 melanoma cells and then vaccinated with Trp2 and gp100 antigenic peptides as described in Methods. On day 15, CD8⁺ T cells were isolated from TIL, labelled with anti-CD8, -Nrp-1 and -PD-1 mAb, and Trp-2 and gp100 dextramers, and then percentages of antigen-specific T cells were determined. Right: Percentages of Trp2 and gp100 dextramer-positive T cells among Nrp-1⁺PD-1^{hi}, Nrp-1⁻PD-1⁺ and Nrp-1⁻PD-1⁻ TIL. **b.** Cytoplasmic expression of IFN γ and TNF α in Nrp-1⁺PD-1^{hi}, Nrp-1⁻PD-1⁺ and Nrp-1⁻PD-1⁻ CD8⁺ T cells. TIL were stimulated for 5 h with autologous tumour cells, stained with anti-CD8, -Nrp-1 and -PD-1 mAb and, after membrane permeabilization, with anti-IFN γ and -TNF α mAb (n=18).
 (legend continued on next page)

c. Degranulation capacity of CD8⁺ TIL. TIL were stimulated with autologous tumour cells; then, Nrp-1⁺PD-1^{hi}, Nrp-1⁺PD-1⁺ and Nrp-1⁺PD-1⁻ T-cell subsets were analysed for surface expression of CD107a. Mean percentages of CD107a⁺ lymphocytes are shown (n=16). **d.** Cytotoxic activity of freshly isolated CD8⁺ TIL toward B16F10 tumour cells. CD8⁺ TIL were pre-incubated in medium or with anti-Nrp-1, anti-PD-1, a combination of both blocking mAb or an isotype control; then, cytotoxicity toward autologous tumour cells was determined by 4 h and 12 h ⁵¹Cr release assay at 50:1 E:T ratio. **e.** Increase in MHC class I and PD-L1 expression on B16F10 tumour cells co-cultured with autologous CD8⁺ TIL. Kinetic studies of H-2K^b/D^b and PD-L1 expression on B16F10 cells co-cultured with CD8⁺ TIL for indicated time points. Expression profiles (left), percentages of positive cells (middle) and gMFI (right) of MHC-class I (upper panels) and PD-L1⁺ (lower panels) tumour cells are shown. **f.** Anti-Nrp-1 re-establishes migration of Nrp-1⁺PD-1^{hi} T cells toward B16F10 tumour cell supernatant. TIL were pre-incubated for 30 min in medium or with neutralizing anti-Nrp-1, -PD-1, a combination of both mAb or an isotype control. Cells were seeded in the upper chambers of transwell plates and then exposed to a gradient of B16F10 supernatant loaded in the lower chambers. The numbers of Nrp-1⁺PD-1^{hi}, Nrp-1⁺PD-1⁺ and Nrp-1⁺PD-1⁻ T cells that had migrated into the lower chambers were determined by flow cytometry. Results are representative of 3-to-4 independent experiments. Data presented as mean ± SEM. * p<0.05; ** p<0.01 and *** p<0.001.

To further investigate the influence of Nrp-1 on CD8⁺ TIL functions, we also performed migration assays in the presence of anti-Nrp-1 and/or anti-PD-1 neutralizing mAb of CD8⁺ TIL seeded for 2 h in upper chambers of transwell plates, with B16F10 target cells in the lower chambers. FACS analysis of T cells having migrated to the lower chambers in control conditions showed no difference between Nrp-1⁺PD-1⁻, Nrp-1⁺PD-1⁺ and Nrp-1⁺PD-1^{hi} T-cell subsets (Fig. 5f). However, when TIL were pre-incubated with anti-Nrp-1 neutralizing mAb, the migration index of Nrp-1⁺PD-1^{hi} T cells was strongly increased. Whatever the TIL subset, no effect was observed with anti-PD-1 alone. Moreover, within the Nrp-1⁺PD-1^{hi} T-cell subset, no further increase was observed with a combination of anti-Nrp-1 and PD-1 mAb. These results support the conclusion that Nrp-1 behaves as a true CD8 T-cell inhibitory receptor *in vitro* to impair the effector functions of anti-tumour CD8⁺ TIL.

Therapeutic Nrp-1 blockade potentiates tumour growth control by anti-PD-1 *in vivo*

The above experiments suggested that Nrp-1 is a novel immune checkpoint expressed by tumour-reactive T cells that could impair their functional activities following interaction with its ligand Sema-3B. To directly test this hypothesis *in vivo* and therefore investigate the potential of neutralizing Nrp-1 via immunotherapeutic approaches, C57BL/6 mice were engrafted with B16F10 melanoma and treated at days 6, 8, 10, 12 and 14 with anti-Nrp-1,

anti-PD-1, a combination of both, or an isotype control mAb. Both tumour volume and tumour weight were followed up. Results showed that intratumoral (i.t.) administration of anti-Nrp-1 mAb, or intraperitoneal (i.p.) injection of anti-PD-1 mAb, inhibited tumour growth as compared to control treatment (Fig. 6a and 6b). Importantly, a combination of anti-Nrp-1 plus anti-PD-1 was clearly additive, with much better control of tumour progression (Fig. 6a, Supplementary Fig. 4d). A strong reduction in tumour weight measured at the experiment endpoint was also observed (Fig. 6b).

To further assess mechanisms involved in the therapeutic effect of anti-Nrp-1 plus anti-PD-1 combination, we analysed CD8⁺ TIL from tumours of the different groups of mice used above. Results showed much larger CD8⁺ T-cell infiltrates in tumours obtained from mice treated with the anti-Nrp-1 plus anti-PD-1 combination than from mice treated with each mAb alone or the isotype control (Fig. 6c). Increased CD8⁺:CD4⁺ Treg ratios were also observed in this group of mice compared to control mice (Fig. 6d). These CD8⁺ TIL expressed much higher levels of terminally differentiated effector T-cell marker KLRG1, as well as increased levels of proliferation marker Ki-67 and of serine protease granzyme B (Fig. 6e). Overall, these results demonstrate that anti-Nrp-1 plus anti-PD-1 *in vivo* treatment enhances tumour infiltration by Nrp-1⁺PD-1^{hi} CD8⁺ TIL, with increased proliferative and killing capacities, leading to strong tumour regression. They also further emphasize the therapeutic potential and benefits of the anti-Nrp-1/anti-PD-1 combination in cancer immunotherapy.

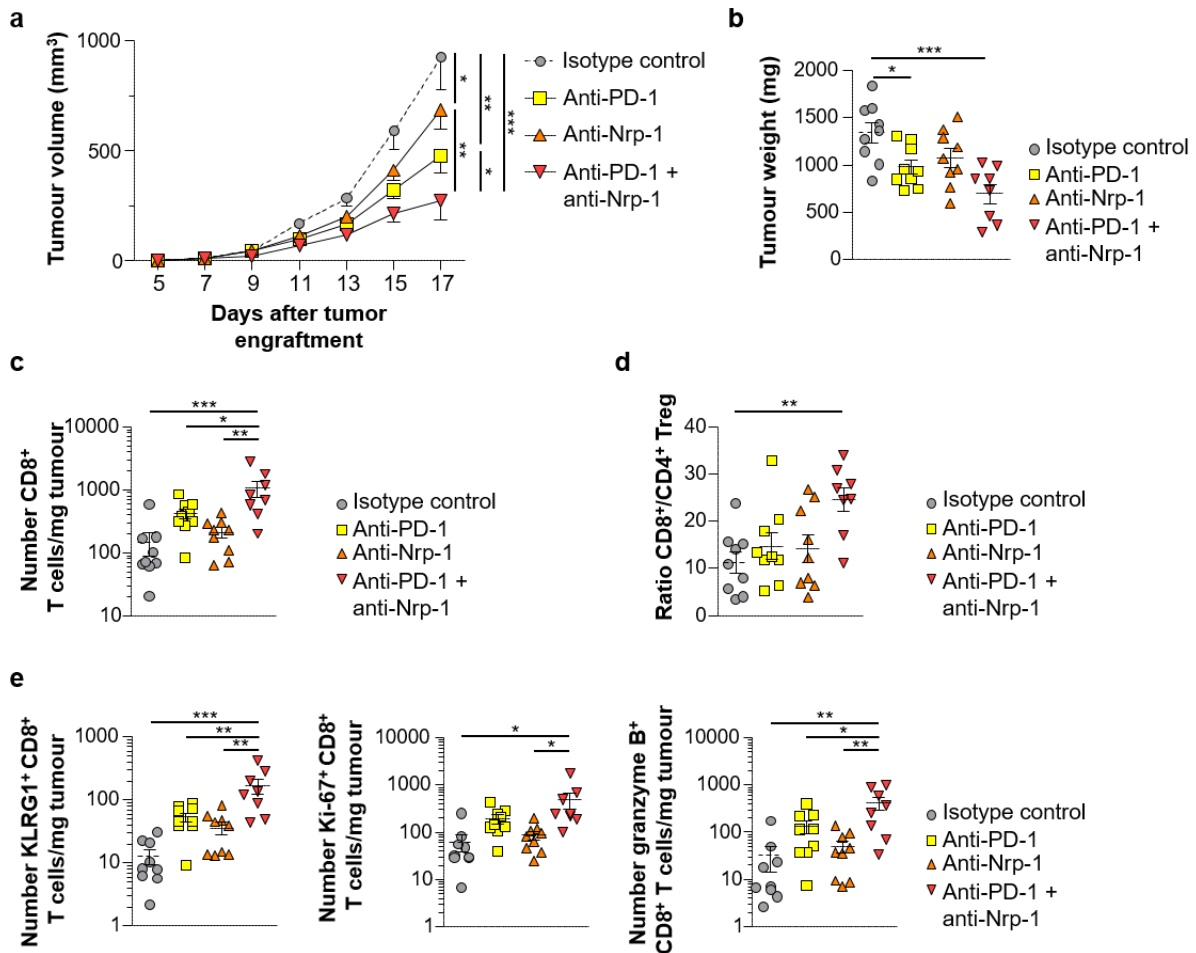


Figure 6 - Anti-Nrp-1 mAb combined with anti-PD-1 improve tumour progression control.

a. C57BL/6 mice were engrafted with B16F10 melanoma cells and then treated i.p. with anti-PD-1, i.t. with anti-Nrp-1, or a combination of both mAb injected in parallel at each site at days 6, 8, 10, 12 and 14 after tumour inoculation. An isotype control was included. Tumour volumes, measured every second day in mm^3 , are given as means (\pm SEM) of 5-to-7 mice/group. Mice were sacrificed at day 17, since tumour size exceeded the tolerated institutional limit. Data are means of two independent experiments out of three. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. **b.** Weight of tumours from mice untreated and treated with blocking mAb. Tumours were recovered at day 16 after engraftment and weighed. **c.** Absolute cell counts of $\text{CD}3^+ \text{CD}8^+$ TIL. Numbers of $\text{CD}8^+$ T cells per milligram of tumour were determined at day 16 as described in Methods. **d.** Ratio of $\text{CD}8^+/\text{CD}4^+$ Treg cells in tumours from mice treated with blocking mAb or an isotype control. **e.** Absolute cell counts of KLRG1^+ , Ki-67^+ and granzyme $\text{B}^+ \text{CD}8^+$ T cells from B16F10 TIL. Numbers of T-cell subsets per milligram of tumour from mice treated with anti-Nrp-1, anti-PD-1, a combination of both mAb or an isotype control. Data are means from two independent experiments out of three. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Discussion

Nrp-1 is essential in axonal guidance, through its capacity to bind class 3 chemorepulsive semaphorin proteins^{9, 20}, and in angiogenesis, via its interaction with VEGF and VEGF receptors (VEGFR)^{21, 22}. Nrp-1 is also involved in cardiovascular and neuronal development, cell migration, immunity and cancer^{8, 23, 24}. Indeed, tumour cells frequently express semaphorins and their receptors neuropilins and plexins, which can regulate malignant cell behaviour and contribute to malignant potential²⁴. Nrp-1 is also highly expressed on tumour vasculature, functioning as a mediator of tumour initiation and progression, associated with poor clinical outcome⁸. For instance, high expression of Nrp-1 observed in lung cancer correlates with invasive capacity and short disease-free survival²⁵. Moreover, cancer cells often produce secreted members of the semaphorin family, including Sema-3A and Sema-3B, also contributing to tumour escape from the immune response^{24, 26}. We now report, in both human NSCLC tumours and murine B16F10 melanoma, that Nrp-1 delineates a particular subset of CD8⁺ TIL, enriched with tumour antigen-specific T lymphocytes, and also expressing high levels of the PD-1 inhibitory receptor. In particular, we show that Nrp-1 works as a negative regulator of antitumoral activities of this CTL subset, and that blocking of this receptor *in vivo* strongly improves tumour regression elicited by anti-PD-1 immunotherapy.

Multiple roles for neuropilins and semaphorins in the immune system have emerged in recent years^{27, 28}. Sema-3A has been reported to inhibit primary human T-cell proliferation and cytokine production under anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation²⁶. It also promotes T-cell apoptosis²⁹ and inhibits non-specific cytotoxic activity of NK cells in mixed lymphocyte cultures²⁶. The influence of Sema-3A on T-cell migration has also been studied. In particular, this chemorepulsive molecule has been reported to inhibit immune cell migration and response of human T cells to chemokine gradients^{30, 31}. Chemorepulsive effects of Sema-3A

on human thymocytes have been reported, as well as inhibition of T-cell migratory responses triggered by chemokine CXCL12^{32,33}. Accordingly, we found that soluble Sema-3A binds to Nrp-1 molecules expressed on the surface of human lung tumour-specific CTL and inhibits their migratory capacity to a gradient of CXCL12 chemokine. Importantly, our results also showed that TCR-mediated killing of autologous human lung cancer cells was inhibited in the presence of Sema-3A, highlighting a possible inhibitory role of the Nrp-1/Sema-3A axis in CTL functions.

Nrp-1 is usually not expressed by resting T cells. However, its expression is triggered after T-cell activation, suggesting that Nrp-1 is an additional T-cell activation biomarker³⁴. Regulation of Nrp-1 expression during adaptive immune responses is likely an essential element for understanding its physiological role. In this context, activated T cells derived from inflammatory environments were described as expressing this surface molecule¹⁶. Indeed, Nrp-1 was highly induced on CD8⁺ T lymphocytes engaging self-antigen, including human melanoma TIL, supporting the hypothesis that it may correspond to a potential biomarker for dysfunctional T cells. We show here that Nrp-1 is co-expressed with CD25 and PD-1 on both CD4⁺ and CD8⁺ TIL from human NSCLC. Moreover, on CD8⁺ TIL, this expression is restricted to a PD-1^{hi} T-cell subset. Various populations of CD8⁺ TIL have been recently described based on PD-1 expression levels: negative (PD-1^N), intermediate (PD-1^{int}) and high (PD-1^T)³⁵. Interestingly, we found a very good correlation between PD-1 and Nrp-1 expression (see Fig. 4b). Thus, the aforementioned PD-1^T TIL subset likely corresponds to cells expressing the highest levels of PD-1 and Nrp-1 in our study. This is a crucial assumption, as this subset has been recently reported to correspond to an exhausted TIL subset³⁵. Accordingly, in the present study, we found that Nrp-1⁺PD-1^{hi} TIL express transcription factors Helios, Blimp-1, IRF-4 and NFATc1, associated with activation/exhaustion³⁶⁻³⁹. Co-expression of Nrp-1 and Helios on CD4⁺ T cells was also

observed on TIL from human liver metastases of colorectal cancer¹⁵. Another characteristic of PD-1^T TIL is that they display high tumour recognition capacity and are predictive of responses of human NSCLC patients to PD-1 blockade³⁵. Likewise, we found, in B16F10 tumours, that a significant percentage of Nrp-1⁺PD-1^{hi} CD8⁺ TIL strongly expressed granzyme B and cell proliferation marker Ki-67, and secreted high levels of IFN γ . Moreover, this Nrp-1⁺PD-1^{hi} T-cell subpopulation was the most strongly enriched with MAA-specific CD8⁺ T lymphocytes. We therefore assume that Nrp-1 can be used as a novel marker for identifying this important CD8⁺ tumour-reactive TIL population. Overall, these findings suggest that, in an anti-tumour immune response context, Nrp-1 is a very late T-cell activation marker and that its co-expression with high levels of PD-1 might be another characteristic of exhausted antigen-experienced CD8⁺ TIL.

Expression of CTLA-4, PD-1 and Tim-3 molecules was associated with T-cell exhaustion in chronic viral infections and tumour progression⁴⁰⁻⁴⁴. These T-cell inhibitory receptors are important for regulating immune responses in peripheral tissues and maintaining self-tolerance. Along the same lines, Nrp-1 is induced on tolerant self-reactive CD8⁺ T cells expressing known regulatory receptors¹⁶. In the present report, we show that Nrp-1 is often associated with a broad panel of inhibitory receptors, such as CTLA-4, Tim-3 and LAG-3, and characterizes a dysfunctional PD-1^{hi} CD8⁺ TIL subpopulation. This particular phenotype, characteristic of T cells infiltrating an inflamed tumour microenvironment, may further explain the paradox of tumour progression, despite the presence of an ongoing T-cell response toward malignant cells. We also show here that anti-Nrp-1 neutralising mAb, in particular when associated with anti-PD-1, re-established *ex vivo* the functionality of these T cells, such as externalization of CD107a and TCR-mediated cytotoxicity toward the cognate tumour. Remarkably, anti-Nrp-1 also restore the migratory capacity of Nrp-1⁺PD-1^{hi} T cells, likely by blocking the interaction of Nrp-1 with its ligands Sema-3A or Sema-3B. Anti-PD-1 blocking

mAb have no such effect. Semaphorins have been reported to govern cell migration by regulating integrin-mediated adhesion and actin cytoskeleton⁴⁵. A similar process may occur in tumours to explain how Nrp-1 signalling specifically affects T-cell migratory potential, possibly downstream plexin-A, which forms stable heterodimers with Nrp-1 and acts as a signal-transducing module for the Sema-3/Nrp-1/Plxn-A complex at the plasma membrane⁴⁶.

It is becoming increasingly clear that Nrp-1 and its ligands Sema-3A/-3B play important roles during the effector phase of various immune processes, including anti-tumour T-cell responses. A growing body of evidence indicates that these molecules are commonly expressed by cancer cells and immune cells, and that they may affect anti-tumour immune responses. In this regard, it has been reported that LKB1 protein kinase⁴⁷ and the ABL1 inhibitor Imatinib⁴⁸ inhibit tumour growth and angiogenesis by enhancing Nrp-1 degradation. Moreover, synthetic anti-Nrp-1 peptides²⁵ and blocking anti-Nrp-1 mAb have been developed⁴⁹ for targeting tumour angiogenesis. In this context, our work is a new building block, since we now show that Nrp-1 negatively influences CD8 T-cell immunity and responses to anti-PD-1 cancer immunotherapy. Indeed, our *in vivo* experiments have revealed that, like the anti-PD-1 blockade, anti-Nrp-1 immunotherapy is able to inhibit melanoma progression in C57BL/6 mice. Moreover, a combination of the two antibodies is more efficient at reducing tumour growth associated with enhanced tumour infiltration by CD8⁺ effector T cells, with an increase in the CD8⁺:CD4⁺ T-cell ratio. This is an important finding, since the limited success of anti-PD-1 cancer immunotherapy is often associated with weak tumour infiltration by specific CD8⁺ T cells^{50, 51}. Concomitant blockade of Nrp-1 and PD-1 could remedy this “cold-tumour” situation, thus providing a new immunotherapeutic strategy for further improving specific immune responses during cancer disease.

Methods

Human lung tumours and freshly isolated lung TIL

Fresh NSCLC tumours were obtained from the Centre chirurgical Marie Lannelongue and the Institut mutualiste Montsouris. RNA was immediately extracted with TRIzol reagent (Invitrogen), reverse-transcribed and then subjected to qRT-PCR.

For freshly isolated TIL, human lung tumours were dissociated mechanically and enzymatically using a tumour dissociation kit (MACS, Miltenyi Biotec). Mononuclear cells were then isolated by a Ficoll-Hypaque gradient. All human experiments were approved by the Institutional Review Board of the Gustave Roussy Institute.

Derivation and culture of the P62 CTL clone and IGR-Pub autologous tumour cell line

NSCLC cell line IGR-Pub was derived from the tumour specimen of patient Pub adenocarcinoma as described¹⁷. Autologous CTL clone P62 was derived from TIL of the same patient⁵². T-cell clone P62 was stimulated every month with irradiated autologous IGR-Pub tumour cells and irradiated allogeneic Laz509 EBV-transformed B cells in RPMI-1640 medium supplemented with 10% human AB serum and rIL-2¹⁷.

The allogeneic NSCLC cell lines IGR-B2, IGR-Heu, ADC-Coco, ADC-Tor and ADC-Let were derived from tumour specimens in one of our laboratories and maintained in culture as described⁵². A549 (ADC), SK-Mes, Ludlu (SCC), DMS53 (SCLC), H460, H1155 (LCC) and H1355 (ADC) were previously reported⁵³.

The SV40-immortalized human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- (16HBE), used as a control, was previously described⁵⁴.

Quantitative real-time (RT)-PCR

Total RNA was immediately extracted from sorted cell populations using the Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek) or TRIzol reagent (Invitrogen) for human samples. cDNA was synthesised using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischer Scientific). qRT-PCR was performed on a Step-One Plus (Applied Biosystems) using Maxima SYBR Green Master Mix (ThermoFischer Scientific). Expression levels of transcripts were normalized to 18S expression. PCR primers and probes for human (*NRPI-2*, *PLXNA1-4*, *PLXND1*, *SEMA3A-G*, 18S) and mouse (*Batf*, *Cd244*, *Tigit*, *Egr2*, 18S) genes were designed by Sigma-Aldrich and used according to the manufacturer's recommendations.

B16F10 melanoma cell line, tumour engraftment and peptide cancer vaccine

The B16F10 melanoma cell line (H-2^b) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Tumour cells were grown in DMEM/F-12 medium (ThermoFischer Scientific) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and antibiotics (50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin).

Female C57BL/6J mice were purchased from Envigo. For each experiment, groups of 4-to-10 mice 7-9 weeks of age received 2×10^5 B16F10 melanoma cells subcutaneously (s.c.) in the right flank. All animals were housed at Gustave Roussy's animal facility and treated in accordance with institutional animal guidelines.

For the cancer vaccine, C57BL/6J mice were immunized s.c. with 100 µg of gp100 (KVPRNQDWL) and/or Trp2 (SVYDFVWL) peptides (GeneCust) plus 25µg of poly(I:C) adjuvant (InvivoGen), at day 5 and every week at the tail base.

Murine TIL isolation

Tumours were harvested at days 8-to-20 and digested for 40 min at 37°C according to Tumour Dissociation Kit protocol (Miltenyi Biotec). Tumours were crushed on 100 µm cell strainers and washed twice with PBS 2% fetal calf serum (FCS). Single cell suspensions were enriched for CD45⁺ cells or CD8⁺ cells using the MultiMACS system (Miltenyi Biotec). Briefly, cells from tumour tissues were labelled with anti-CD45 or anti-CD8a microbeads (Miltenyi Biotec), and then purified using the POSSEL program on MultiMACS. The positive fraction was recovered for TIL analysis by flow cytometry or *ex vivo* assays.

Antibodies and flow cytometry

For human cell surface and intracellular staining, anti-CD3 (UCHT1), -CD4 (RPA-T4), -CD8α (RPA-T8), -CD25 (CD25-3G10), -FoxP3 (259D), -PD-1 (J105) and -Nrp-1 (12C2) mAb, and rSema-3A-Fc were used. Cell surface and intracellular staining of mouse cells was performed on single-cell suspensions using antibodies specific to the following molecules: CD3 (17A2), CD4 (RM4-5), CD8α (53-6.7), CTLA-4 (UC10-4B9), PD-1 (29F.1A12), Tim-3 (RMT3-23), LAG-3 (C9B7W), Nrp-1 (3E12), T-bet (REA102), NFATc1 (7A6), Blimp-1 (5E7), Helios (22F6), IRF-4 (REA201), Ki-67 (REA183) and granzyme B (GB11). Dead cells were excluded using the Live/Dead Fixable Blue Dead Cell Stain Kit (Invitrogen).

For intracellular staining, cells were fixed/permeabilized with the Foxp3 Staining Buffer Set according to the manufacturer's instructions (eBioscience). Staining of Trp2 and gp100-specific T cells was performed using H-2Kb/SVYDFVWL and H-2Db/KVPRNQDWL dextramers, respectively (Immudex). Flow cytometric analysis was conducted on an LSR Fortessa (BD) and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

***In vitro* migration assay**

Freshly isolated CD8⁺ TIL were incubated for 30 min to 1 h either in medium or in the presence of neutralizing anti-Nrp-1 mAb (R&D system MAB59941), anti-PD-1 (Biolegend clone RMP1-14) or isotype control (Biolegend Isotype Rat IgG_{2a} RTK2758). B16F10 tumour cells were cultured for 2 days in the lower chambers of Transwell plates (Corning) and then TIL were seeded in the upper chambers to trigger T-cell migration. After 2 h at 37°C, the number of CD8⁺ T cells that had migrated into the lower chambers was counted by flow cytometry and phenotyped.

For experiments with CTL clone P62, activated T cells were incubated for 30 min to 1 h either with BSA or Sema-3A-Fc (100 ng/ml, R&D system), and their ability to migrate toward the human rCXCL12 (50 nM) was evaluated. Results were expressed as chemotaxis index.

***In vitro* T-cell stimulation, cytokine production and cytotoxic experiments**

Purified CD45⁺ TIL were co-cultured for 5 h with B16F10 tumour cells, pulsed with Trp2 (1 µg) and gp100 (1 µg) peptides, in the presence of Brefeldin A (eBioscience), monensin (Merck) and anti-CD107a mAb (1D4B). TIL were stained with mAb specific for surface proteins prior to fixation and permeabilization. Permeabilized cells were then stained with anti-IFN-γ (XMG1.2) and anti-TNF-α (MP6-XT22) mAb.

For cytotoxicity experiments, freshly isolated CD8⁺ TIL were either kept in medium or pretreated with neutralizing anti-Nrp-1 (R&D system MAB59941), anti-PD-1 (clone RMP1-14) or isotype controls (Biolegend Isotype Rat IgG_{2a} RTK2758). Cytotoxic activity toward the B16F10 cell line, pulsed with Trp2 and gp100 peptides, was evaluated using a conventional 4 h and overnight chromium (⁵¹Cr) release assay.

For experiments with CTL clone P62, activated T cells were incubated for 30 min to 1 h either with BSA or Sema-3A-Fc (100 ng/ml), and their cytotoxic activity toward the autologous tumour cell was evaluated.

Western blot analyses

Equivalent amounts of protein extracts from tumour cell lines were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane as described⁵⁵. Blots were then probed with rat anti-Sema-3B mAb (R&D system MAB5440), mouse anti-Sema-3A (R&D system MAB1250) or anti- β -actin-peroxidase (Merck A3854), followed by secondary HRP-conjugated Ab.

***In vivo* PD-1 and Nrp-1 blockade**

Mice were treated i.p. with 100 μ g/mouse of anti-PD-1 (Bio-X-Cell; RMP1-14) mAb and/or i.t. with 25 μ g/mouse of anti-Nrp-1 (R&D system; MAB59941) mAb. For tumour outgrowth experiments, mice were treated on days 6, 8, 10, 12 and 14 after tumour inoculation, and TIL were sorted and analysed on day 16.

Statistical analysis

Statistical significance was determined with the one-way or two-way ANOVA test with Bonferroni correction, or with the two-tailed Student t test (GraphPad Prism, GraphPad software).

Data availability

The authors state that all data generated during this study are included in the article and its supplementary information file, and are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments

We are grateful to all members of Gustave Roussy's animal facility (Plateforme d'Evaluation pré-clinique) for their help with *in vivo* experiments. We thank the staff of the cytometry facility (Plateforme d'Imagerie-Cytométrie) of Gustave Roussy for flow cytometry analyses. This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Institut national du Cancer (INCa). ML was a recipient of a MENRT fellowship from the French Ministry of Research and the Ligue contre le Cancer; SC and EV are supported by a grant from INCa.

Author contributions

Conception and design: M Leclerc, G Bismuth and F Mami-Chouaib.^{[1][2]}

Development of methodology: M Leclerc and F Mami-Chouaib.

Acquisition of data (providing animals, acquiring and managing patients, providing facilities, etc.): M Leclerc, G Bismuth, E Voilin, S Corgnac, P Validire and F Mami-Chouaib.^{[1][2]}

Analysis and interpretation of data (e.g. statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M Leclerc and F Mami-Chouaib.^{[1][2]}

Writing, reviewing and/or revision of the manuscript: M Leclerc, G Bismuth and F Mami-Chouaib.^{[1][2]}

Administrative, technical and material support (i.e. reporting and organizing data, constructing databases): M Leclerc, Gwendoline Gros, P Validire and F Mami-Chouaib.

Study supervision: F Mami-Chouaib.

Potential competing interests: The authors have no competing interests.

* **To whom correspondence and material requests should be addressed:** Fathia Mami-Chouaib, INSERM UMR 1186, Gustave Roussy. 39, rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif. Phone: +33 1 42 11 49 65, Fax: +33 1 42 11 52 88, e-mail: fathia.mami-chouaib@gustaveroussy.fr and fathia.mami-chouaib@inserm.fr

References

1. Mrass, P. *et al.* Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells. *J Exp Med* **203**, 2749-2761 (2006).
2. Topalian, S.L., Drake, C.G. & Pardoll, D.M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**, 450-461 (2015).
3. McGranahan, N. *et al.* Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* **351**, 1463-1469 (2016).
4. Phan, G.Q. *et al.* Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8372-8377 (2003).
5. Topalian, S.L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* **366**, 2443-2454 (2012).
6. Tumei, P.C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568-571 (2014).
7. Rizvi, N.A. *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124-128 (2015).
8. Prud'homme, G.J. & Glinka, Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* **3**, 921-939 (2012).
9. Kolodkin, A.L. *et al.* Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **90**, 753-762 (1997).
10. He, Z. & Tessier-Lavigne, M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* **90**, 739-751 (1997).

11. Yadav, M. *et al.* Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* **209**, 1713-1722, S1711-1719 (2012).
12. Delgoffe, G.M. *et al.* Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* **501**, 252-256 (2013).
13. Hansen, W. *et al.* Neuropilin 1 deficiency on CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med* **209**, 2001-2016 (2012).
14. Battaglia, A. *et al.* Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology* **123**, 129-138 (2008).
15. Chaudhary, B. & Elkord, E. Novel expression of Neuropilin 1 on human tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer liver metastases. *Expert Opin Ther Targets* **19**, 147-161 (2015).
16. Jackson, S.R., Berrien-Elliott, M., Yuan, J., Hsueh, E.C. & Teague, R.M. Neuropilin-1 expression is induced on tolerant self-reactive CD8⁺ T cells but is dispensable for the tolerant phenotype. *PLoS One* **9**, e110707 (2014).
17. Dorothee, G. *et al.* Tumor-infiltrating CD4⁺ T lymphocytes express APO2 ligand (APO2L)/TRAIL upon specific stimulation with autologous lung carcinoma cells: role of IFN- α on APO2L/TRAIL expression and -mediated cytotoxicity. *J Immunol* **169**, 809-817 (2002).
18. Williams, J.B. *et al.* The EGR2 targets LAG-3 and 4-1BB describe and regulate dysfunctional antigen-specific CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* **214**, 381-400 (2017).

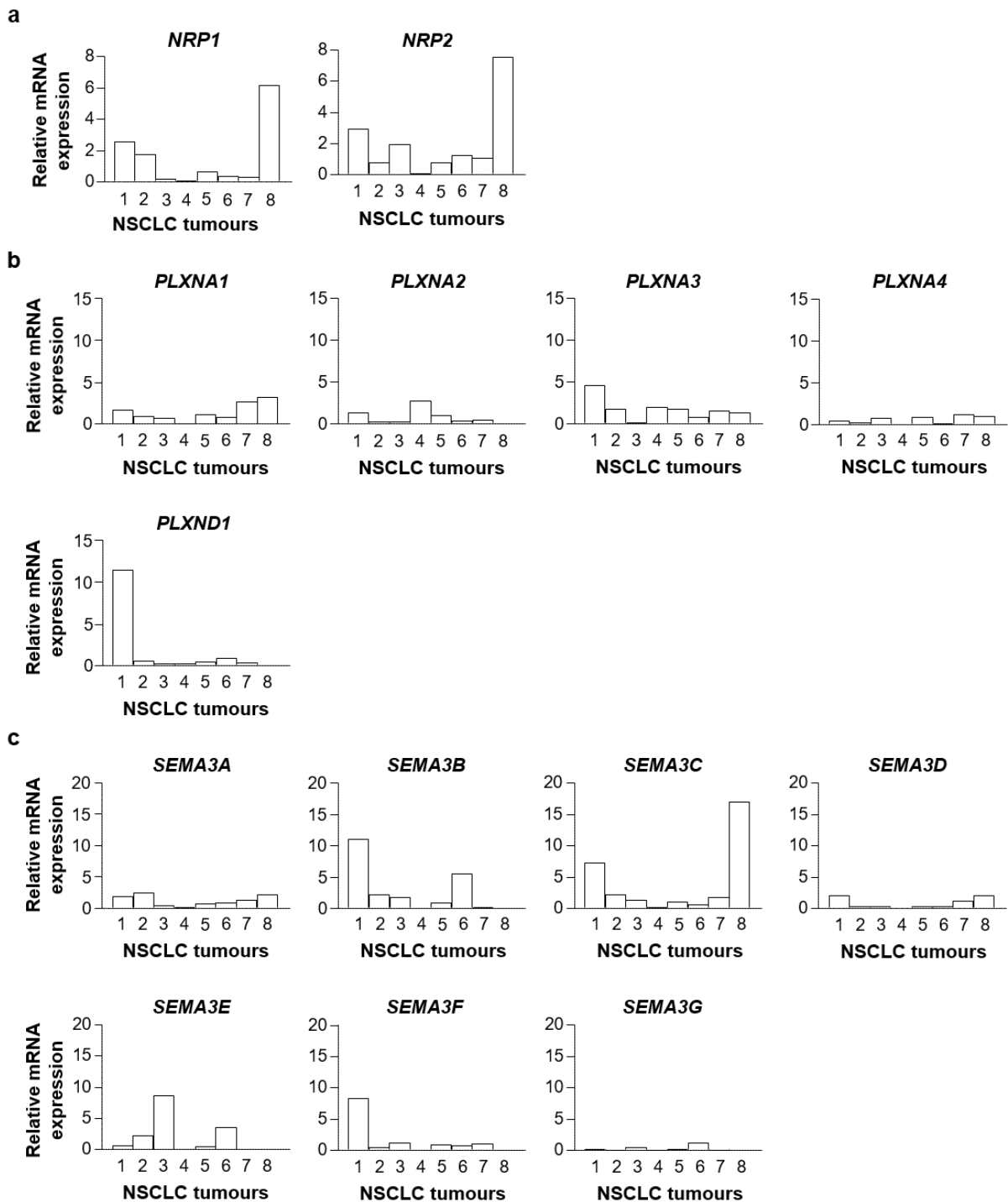
19. Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. & Ahmed, R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J virol* **77**, 4911-4927 (2003).
20. Chen, H., He, Z., Bagri, A. & Tessier-Lavigne, M. Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* **21**, 1283-1290 (1998).
21. Staton, C.A., Kumar, I., Reed, M.W. & Brown, N.J. Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. *J Pathol* **212**, 237-248 (2007).
22. Roskoski, R., Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* **62**, 179-213 (2007).
23. Fujisawa, H. Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J Neurobiol* **59**, 24-33 (2004).
24. Muratori, C. & Tamagnone, L. Semaphorin signals tweaking the tumor microenvironment. *Adv Cancer Res* **114**, 59-85 (2012).
25. Hong, T.M. *et al.* Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 4759-4768 (2007).
26. Catalano, A. *et al.* Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* **107**, 3321-3329 (2006).
27. Suzuki, K., Kumanogoh, A. & Kikutani, H. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat immunol* **9**, 17-23 (2008).
28. Kumanogoh, A. & Kikutani, H. Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nat Rev Immunol* **13**, 802-814 (2013).

29. Moretti, S. *et al.* Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood* **111**, 2290-2299 (2008).
30. Mendes-da-Cruz, D.A., Linhares-Lacerda, L., Smaniotto, S., Dardenne, M. & Savino, W. Semaphorins and neuropilins: new players in the neuroendocrine control of the intrathymic T-cell migration in humans. *Exp physiol* **97**, 1146-1150 (2012).
31. Mendes-da-Cruz, D.A. *et al.* Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins. *FASEB journal* **26**, 4390-4399 (2012).
32. Lepelletier, Y. *et al.* Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5545-5550 (2007).
33. Garcia, F. *et al.* Inhibitory effect of semaphorin-3A, a known axon guidance molecule, in the human thymocyte migration induced by CXCL12. *J Leukoc Biol* **91**, 7-13 (2012).
34. Milpied, P. *et al.* Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol* **39**, 1466-1471 (2009).
35. Thommen, D.S. *et al.* 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 (2018).
36. Bengsch, B. *et al.* Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity* **48**, 1029-1045 e1025 (2018).
37. Shin, H. *et al.* A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **31**, 309-320 (2009).

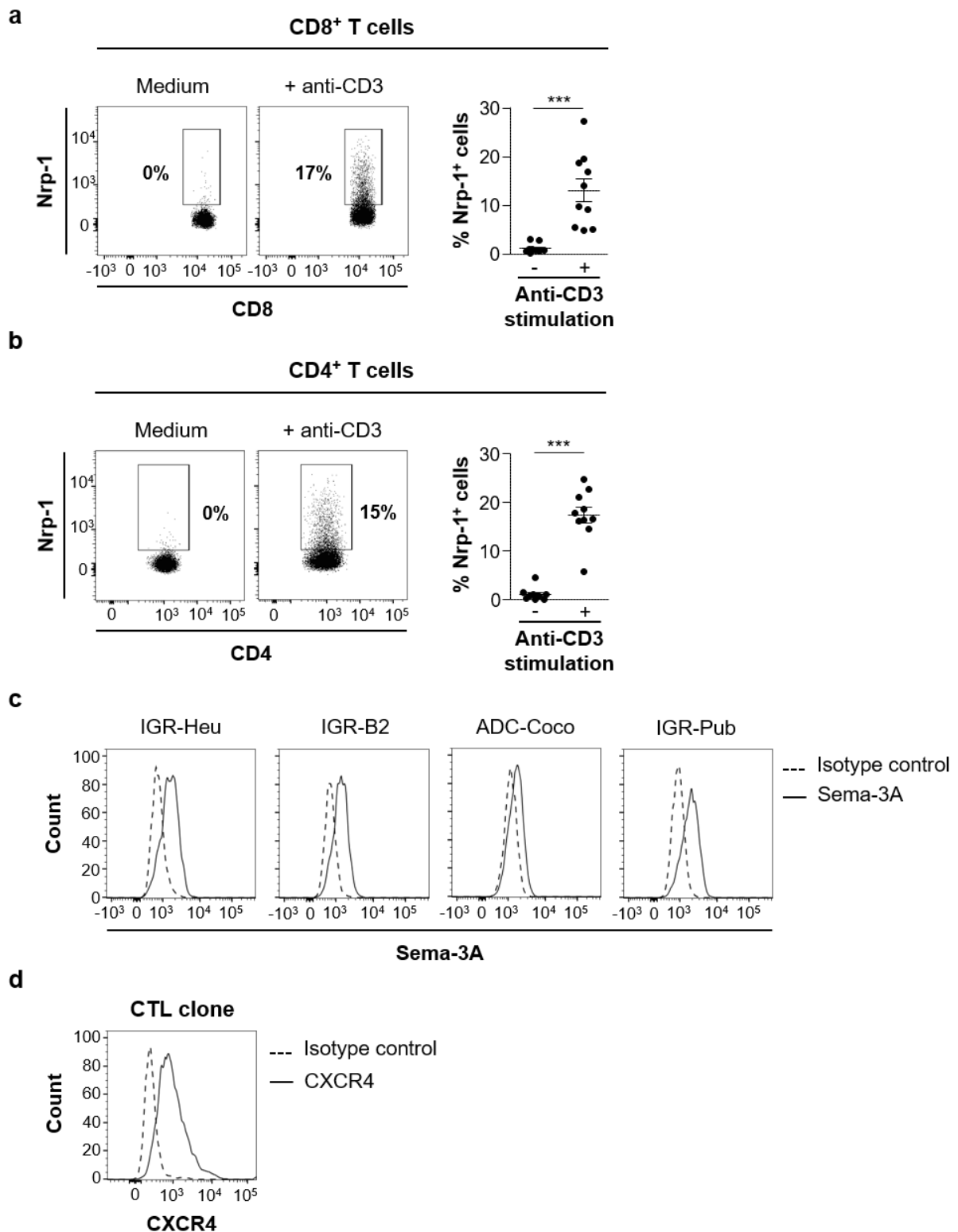
38. Man, K. *et al.* Transcription Factor IRF4 Promotes CD8(+) T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **47**, 1129-1141 e1125 (2017).
39. Martinez, G.J. *et al.* The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. *Immunity* **42**, 265-278 (2015).
40. Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* **12**, 1198-1202 (2006).
41. Freeman, G.J., Wherry, E.J., Ahmed, R. & Sharpe, A.H. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* **203**, 2223-2227 (2006).
42. Kaufmann, D.E. *et al.* Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nature immunology* **8**, 1246-1254 (2007).
43. Blackburn, S.D., Shin, H., Freeman, G.J. & Wherry, E.J. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15016-15021 (2008).
44. Fourcade, J. *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* **207**, 2175-2186 (2010).
45. Casazza, A., Fazzari, P. & Tamagnone, L. Semaphorin signals in cell adhesion and cell migration: functional role and molecular mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **600**, 90-108 (2007).

46. Takahashi, T. *et al.* Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* **99**, 59-69 (1999).
47. Okon, I.S. *et al.* Protein kinase LKB1 promotes RAB7-mediated neuropilin-1 degradation to inhibit angiogenesis. *J Clin Invest* **124**, 4590-4602 (2014).
48. Raimondi, C. *et al.* Imatinib inhibits VEGF-independent angiogenesis by targeting neuropilin 1-dependent ABL1 activation in endothelial cells. *J Exp Med* **211**, 1167-1183 (2014).
49. Liang, W.C. *et al.* Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol* **366**, 815-829 (2007).
50. Herbst, R.S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **515**, 563-567 (2014).
51. Melero, I., Rouzaut, A., Motz, G.T. & Coukos, G. T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy. *Cancer Discov* **4**, 522-526 (2014).
52. Echchakir, H. *et al.* Evidence for in situ expansion of diverse antitumor-specific cytotoxic T lymphocyte clones in a human large cell carcinoma of the lung. *Inter Immunol* **12**, 537-546 (2000).
53. Le Floc'h, A. *et al.* Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *J Exp Med* **204**, 559-570 (2007).

54. Le Maux Chansac, B. *et al.* Potentiation of NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma: role of NKG2D-dependent pathway. *Inter Immunol* **20**, 801-810 (2008).
55. Le Floc'h, A. *et al.* Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a phospholipase Cgamma-dependent pathway. *Cancer Res* **71**, 328-338 (2011).

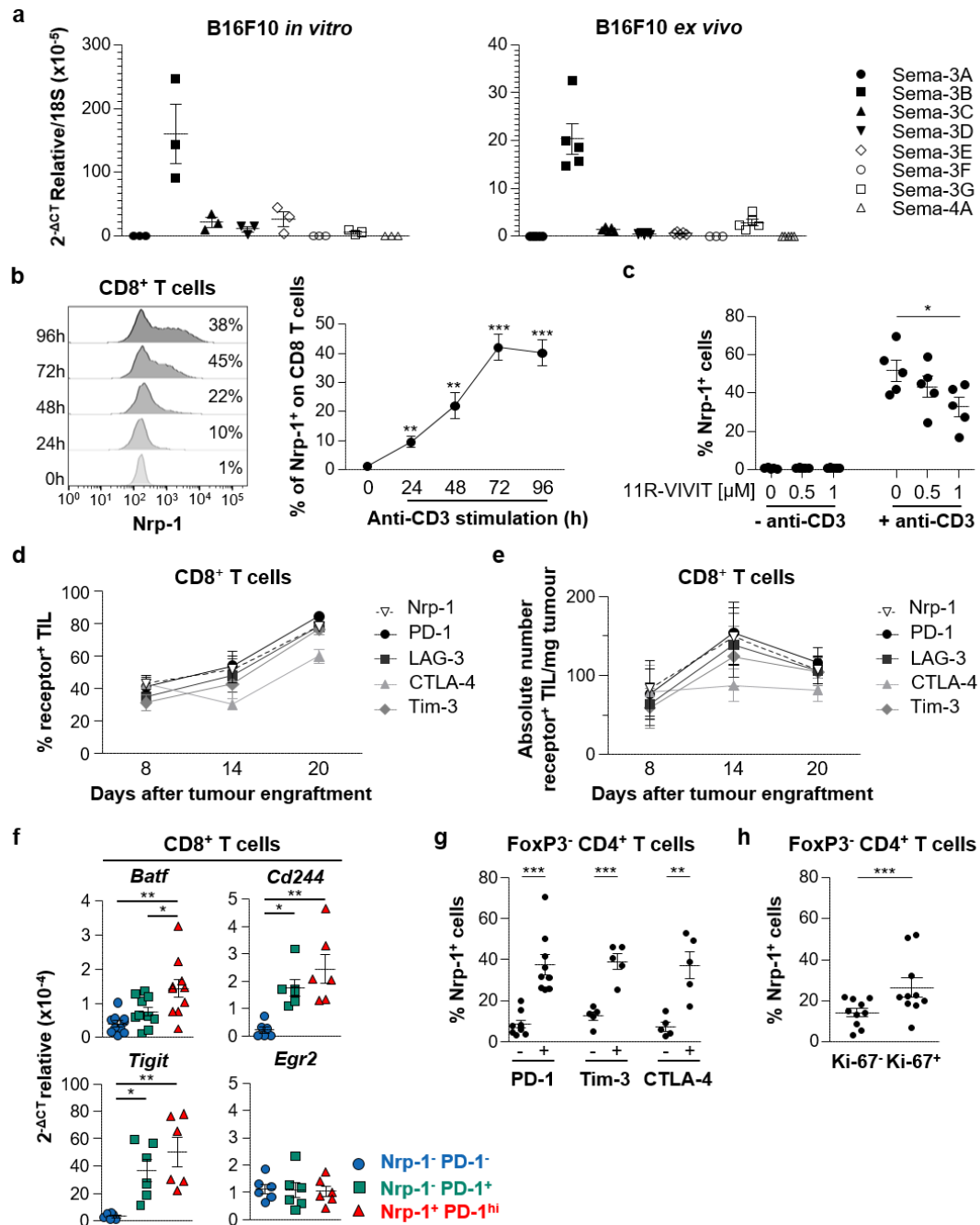


Supplementary Figure 1 - Expression of *NRP*, *PLXN* and *SEMA3* genes in human lung tumour samples.
a. Relative expression of *NRP1* and *NRP2* transcripts in fresh NSCLC tumours performed by qRT-PCR analysis.
b. Relative expression of *PLXNA1*, *PLXNA2*, *PLXNA3*, *PLXNA4* and *PLXND1* transcripts in NSCLC tumours performed by qRT-PCR analysis. **c.** Relative expression of *SEMA3A*, *SEMA3B*, *SEMA3C*, *SEMA3D*, *SEMA3E*, *SEMA3F* and *SEMA3G* transcripts in fresh human lung tumours. Expression was normalized to autologous healthy lung tissues (n=8).



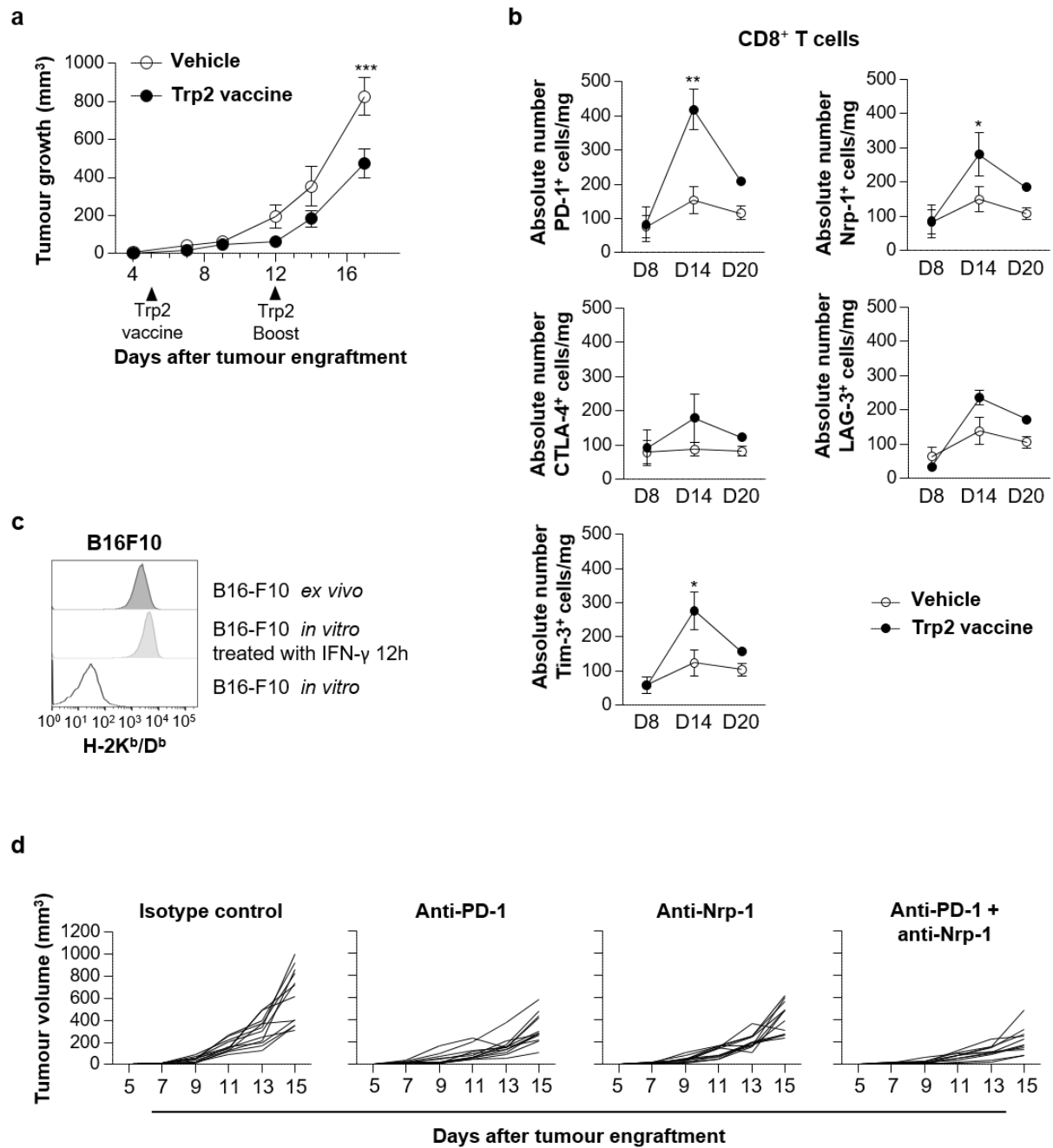
Supplementary Figure 2 - Expression of Nrp-1, Sema-3A and CXCR4 in human cells.

a. Expression of Nrp-1 on CD8⁺ T lymphocytes from HD PBL unstimulated (medium) and stimulated with immobilized anti-CD3 mAb. Right: Percentages of Nrp-1⁺ CD8⁺ T cells in HD PBL unstimulated and stimulated with anti-CD3 (n=10). **b.** Expression of Nrp-1 on CD4⁺ T lymphocytes from HD PBL unstimulated (medium) and stimulated with immobilized anti-CD3. Right: Percentages of Nrp-1⁺ CD4⁺ T cells in HD PBL unstimulated and stimulated with anti-CD3mAb (n=10). **c.** Expression of Sema-3A in human lung tumour cell lines. Intracellular immunofluorescence analysis of Sema-3A expression in NSCLC tumour cells. Full line: Anti-Sema-3A; dashed line: isotypic control mAb. **d.** Expression of CXCR4 chemokine receptor on the human P62 CTL clone surface. Full line: anti-CXCR4 mAb; dashed line: isotypic control.



Supplementary Figure 3 - Expression of Sema-3B and Nrp-1 in the B16F10 mouse melanoma model.

a. Expression of *Sema3* genes in B16F10 tumour cells cultured *in vitro* (left) or engrafted in C57BL/6 mice (right). Relative expression of *Sema3A*, *Sema3B*, *Sema3C*, *Sema3D*, *Sema3E*, *Sema3F*, *Sema3G* and *Sema4A* transcripts in B16F10 tumour cells was determined by qRT-PCR analysis. **b.** Kinetic studies of Nrp-1 expression on CD8⁺ T cells from naive mouse splenocytes unstimulated or stimulated with immobilized anti-CD3 mAb. **c.** NFAT inhibitor inhibits Nrp-1 induction on CD8⁺ T cells. The NFAT inhibitor 11R-VIVIT inhibits expression of Nrp-1 induced by anti-CD3 activation of naive mouse splenocytes in a dose-dependent manner. **d.** Kinetic studies of Nrp-1, PD-1, LAG-3, CTLA-4 and Tim-3 induction on CD8⁺ TIL from B16F10 melanoma engrafted in C57BL/6 mice. Percentages of inhibitory receptor-expressing CD8⁺ T lymphocytes are shown at indicated time points. **e.** Absolute numbers of CD8⁺ TIL expressing Nrp-1, PD-1, LAG-3, CTLA-4 or Tim-3 per milligram of tumour. **f.** Expression of *Batf*, *Cd244*, *Tigit* and *Egr2* genes in mouse CD8⁺ TIL. Relative expression of *Batf*, *Cd244*, *Tigit* and *Egr2* transcripts in Nrp-1⁺PD-1^{hi}, Nrp-1⁺PD-1⁺ and Nrp-1⁻PD-1⁻ T-cell subsets from B16F10 TIL was determined by qRT-PCR analysis at day 15 after tumour engraftment. **g.** Expression of inhibitory receptors on CD4⁺TIL. Percentages of Nrp-1⁺ T cells co-expressing or not PD-1, Tim-3 or CTLA-4 among Foxp3⁻ CD4⁺T lymphocytes from B16F10 melanoma (n=5-9). **h.** Expression of Ki-67 in Nrp-1⁺Foxp3⁻ CD4⁺ T cells. Percentages of Nrp-1⁺ T cells co-expressing or not Ki-67 among Foxp3⁻ CD4⁺ T lymphocytes infiltrating B16F10 melanoma (n=10).



Supplementary Figure 4 - Tumour growth and infiltration of B16F10 melanoma.

a. C57BL/6 mice were engrafted with B16F10 cells and then vaccinated with Trp2 peptide delivered with poly(I:C) at indicated time points (arrows) or with poly(I:C) control alone (vehicle). Tumour volumes, measured every third day in mm³, are given as means (\pm SEM) of 5 mice/group. **b.** Kinetic studies of inhibitory receptor expression on CD8⁺ T cells infiltrating B16F10 tumours. Absolute numbers of CD8⁺ T cells expressing inhibitory receptors in TIL from Trp-2-vaccinated mice and control mice. Numbers of PD-1⁺, Nrp-1⁺, LAG-3⁺, CTLA-4⁺ and Tim-3⁺CD8⁺ TIL per milligram of tumour are determined at indicated time points. **c.** Increase in MHC class I expression on B16F10 cells cultured in the presence of IFN γ or engrafted in C57BL/6 mice. H-2K^b/D^b expression profiles of B16F10 cells cultured *in vitro* in medium alone or with IFN γ for 12 h, or isolated *ex vivo* at day 15. **d.** Growth of B16F10 tumours engrafted in C57BL/6 mice treated with blocking anti-Nrp-1, -PD-1, a combination of both mAb or an isotype control as described in Methods. Individual mouse tumours are shown.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Expression et régulation de la Nrp-1 et des iRs

Nous avons mis en évidence que les TILs CD8⁺ peuvent exprimer la Nrp-1 à leur surface, que ce soit dans le modèle tumoral murin de mélanome ou dans les CBNPC humains, même si cela est dans une moindre mesure. L'expression membranaire de la Nrp-1 sur les TILs CD8⁺ avait déjà été démontrée chez des patients atteints de mélanome (Jackson, Berrien-Elliott et al. 2014). Cependant, la régulation de l'expression de ce récepteur sur cette population lymphocytaire est peu caractérisée. L'état d'activation des LT CD8⁺ semble être crucial pour l'expression de la Nrp-1. En effet, l'engagement du TCR est nécessaire pour l'induction de l'expression de la Nrp-1 à la surface des LT CD8⁺ car l'activation *in vitro* avec un Acm anti-CD3 des LT induit son expression. De plus, nous observons l'expression de ce récepteur uniquement sur les LT CD8⁺ provenant de la tumeur, aucune expression n'a été détectée sur les LT CD8⁺ provenant d'organes lymphoïdes (rate et ganglion drainant la tumeur – modèle souris), ou du sang périphérique de patients atteints de CBNPC ou de donneurs sains (modèle humain). Cependant, il n'est pas à exclure que des cytokines ou des facteurs environnementaux régulent l'expression de la Nrp-1. En effet, il a été montré que l'IL-7 peut augmenter l'expression de la Nrp-1 à la surface des thymocytes *in vitro* (Lepelletier, Smaniotto et al. 2007). Ce résultat est à prendre cependant avec précaution car l'augmentation d'expression de la Nrp-1 est assez faible avec le traitement à l'IL-7. Il serait intéressant de mieux caractériser les facteurs qui interviennent dans la régulation de ce récepteur pour mieux comprendre son mode d'expression et d'action sur cette population immunitaire.

En parallèle, nous avons observé une différence au niveau de l'expression de la Nrp-1 entre les TILs CD8⁺ murins et humains. En effet, une plus forte expression de la Nrp-1 est retrouvée sur les TIL CD8⁺ provenant des tumeurs chez la souris, cela peut être dû à des cinétiques tumorales distinctes ou à des tumeurs de types histologiques différents. Nous émettons l'hypothèse que l'expression de la Nrp-1 est précoce dans le processus tumoral, ou encore que ce récepteur est internalisé puis dégradé en présence de son ligand, tel que c'est connu pour CTLA-4 ou LAG-3 (Valk, Rudd et al. 2008; Bae, Lee et al. 2014). En effet, il est connu que les iRs, tels que PD-1, CTLA-4, Tim-3 ou LAG-3, n'ont pas la même cinétique d'expression à la surface des LT CD8⁺ activés suite à l'engagement de leur TCR. Par exemple, LAG-3 et BTLA sont induits à la surface membranaire plus précocement que PD-1, et leurs expressions sont plus transitoires que ce dernier (Crawford, Angelosanto et al. 2014). Comprendre la régulation d'expression de chacun des iRs au cours du processus tumoral, permettrait de déterminer leurs liens entre eux, et leurs rôles non redondants dans l'inhibition des fonctions effectrices des LT CD8⁺. À ce jour, peu de facteurs *drivers* et/ou régulateurs de l'expression des iRs ont été identifiés, à

l'exception du rôle important de l'engagement du TCR. De plus, l'expression de la Nrp-1 semble indissociable de celle de PD-1. Il serait intéressant d'étudier si la signalisation de PD-1 joue un rôle pour l'expression de la Nrp-1.

II. L'expression de la Nrp-1 est associée à un état dysfonctionnel des LT CD8⁺

Nous avons mis en évidence dans le modèle tumoral murin, que l'expression de la Nrp-1 est liée aux TILs CD8⁺ spécifiques de la tumeur et que ces cellules sont dans un état d'activation plus avancé et à la limite de l'épuisement, comparé aux TILs CD8⁺ qui n'expriment pas ce récepteur. Cependant, ce résultat doit être confirmé dans les tumeurs humaines. La Nrp-1 semble donc être en lien avec le statut dysfonctionnel/épuisé des LT CD8⁺. Néanmoins, l'état d'épuisement des LT CD8⁺ est assez débattu et difficile à définir dans un contexte tumoral. Même si la perte progressive de certaines activités fonctionnelles, telles que la perte de production d'IL-2, de TNF- α puis d'IFN- γ sont très bien définies dans les modèles d'infection chronique, dans le cas du cancer cela est plus compliqué (Wherry and Kurachi 2015). En effet, les antigènes tumoraux déclenchent en général une réponse immunitaire moins forte que les antigènes viraux, et par conséquent l'épuisement des LT CD8⁺ est plus difficile à définir. La seule présence d'iRs à la surface des LT CD8⁺ ne peut définir l'épuisement de ces cellules. De plus, il est maintenant clair qu'il n'existe pas un statut unique d'épuisement, mais tout un ensemble de cellules dysfonctionnelles étant donné que ce devenir s'acquière progressivement (Blackburn, Shin et al. 2008; Bengsch, Ohtani et al. 2018) (**Figure 17**).

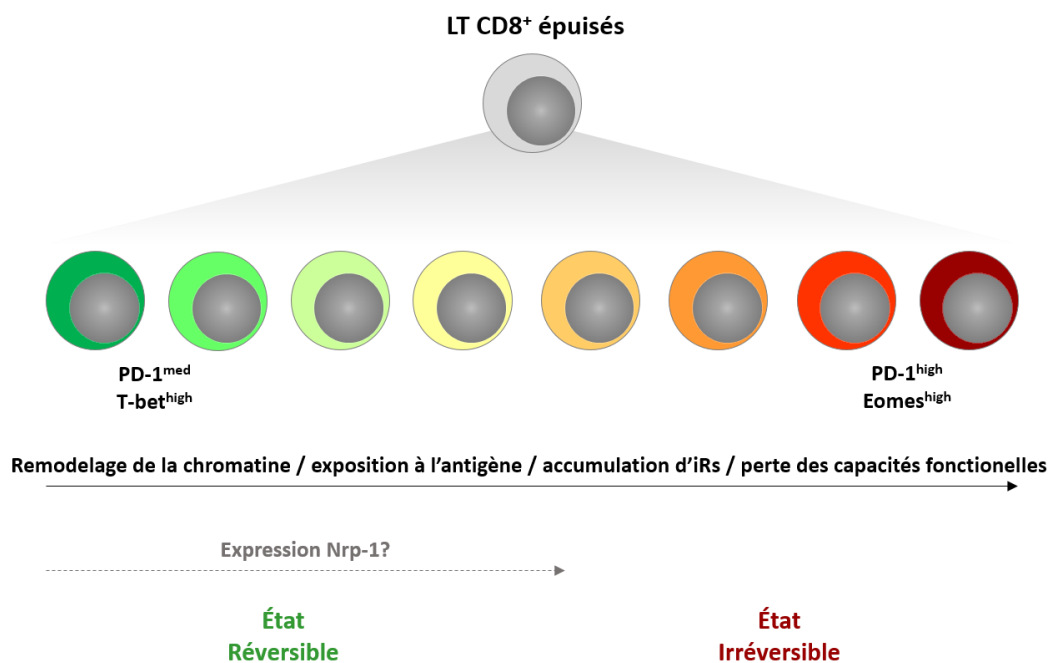


Figure 17 : Les différents états d'épuisement des lymphocytes T CD8⁺

Par conséquent, les populations de LT CD8⁺ dysfonctionnels sont hétérogènes. Ainsi des sous-ensembles de LT CD8⁺ T-bet^{hi} PD-1^{med} et EOMES^{hi} PD-1^{hi} dysfonctionnels ont été identifiés dans un premier temps dans le modèle murin d'infection chronique puis chez l'homme (Blackburn, Shin et al. 2008; Buggert, Tauriainen et al. 2014). Seul le sous-ensemble T-bet^{hi} PD-1^{med} semblerait pouvoir récupérer ses capacités effectrices suite au blocage de la voie PD-1 (**Figure 17**). Il existerait donc différentes formes d'épuisement plus ou moins grave, qui seraient régulées par des facteurs extrinsèques et intrinsèques à ces cellules. Ainsi, le statut de la chromatine semble être un régulateur l'état d'épuisement des LT CD8⁺, de même que l'expression de gènes associés à ce statut (Philip, Fairchild et al. 2017). Deux états de chromatine distincts ont été définis, un état de dysfonctionnement plastique/réversible à partir duquel les LT CD8⁺ peuvent être sauvés et récupérer leur fonctionnalité, et un état de dysfonctionnement fixe dans lequel les cellules sont résistantes à la reprogrammation et deviennent inertes. Il a été identifié des marqueurs de surface associés à chaque état de chromatine qui distinguent les cellules T dysfonctionnelles reprogrammables des cellules T non reprogrammables au sein de tumeurs chez la souris, tels que CD5 et CD101 respectivement. Dans cette étude, la Nrp-1 est associée à l'état de dysfonctionnement réversible, et son expression au niveau transcriptionnel est diminuée lorsqu'il y a remodelage de la chromatine et que les LT CD8⁺ rentrent dans un état dysfonctionnel irréversible (**Figure 17**). Cette étude nous conforte dans le fait que la Nrp-1 sur les LT CD8⁺ serait induite au début du processus tumoral, et associée à un statut d'épuisement peu avancé qui pourrait être restauré grâce aux traitements d'anticorps bloquant les iRs ou par simple retrait à l'exposition de l'antigène. Tandis que les LT CD8⁺ fortement épuisés n'exprimeraient plus la Nrp-1 au niveau membranaire, et ne pourrait répondre aux immunothérapies ciblant les iRs. De plus, grâce aux avancées technologiques récentes, neuf populations distinctes de LT CD8⁺ dysfonctionnels ont été identifiées dans des infections chroniques et des cancers chez l'homme (Bensch, Ohtani et al. 2018). Ces populations ont été caractérisées sur la base de leur phénotype, leur fonction, l'expression de facteurs de transcription et des iRs, permettant de définir la sévérité de l'épuisement. Ceci permettra une meilleure compréhension de l'épuisement des LT CD8⁺ pour l'amélioration des immunothérapies ainsi que la compréhension des mécanismes immunomodulateurs dans l'infection chronique, l'auto-immunité et le cancer. Il faudrait par conséquent déterminer la place du récepteur Nrp-1 dans ces populations dysfonctionnelles chez les patients atteints de cancer.

De plus, il serait intéressant de connaître l'impact de la Nrp-1 dans l'épuisement des LT CD8⁺. Il est connu que les iRs participent au développement du statut d'épuisement en atténuant les signaux positifs du TCR et des aRs (Parry, Chemnitz et al. 2005; Yokosuka, Takamatsu et al. 2012; Clayton, Haaland et al. 2014). Dans notre étude, nous n'avons pas prouvé que la Nrp-1 joue un rôle pour

l'établissement de l'épuisement. Cependant nous avons démontré qu'elle régulait la migration et la capacité cytotoxique des TILs CD8⁺. Pour pouvoir montrer réellement son implication dans l'épuisement des LT CD8⁺, l'utilisation d'un modèle transgénique de souris où la délétion de la Nrp-1 est uniquement effectuée dans les LT CD8⁺, nous permettrait de répondre à cette question. En comparant phénotypiquement ainsi que fonctionnellement les TILs CD8⁺ spécifiques de la tumeur B16F10 provenant de souris C57BL/6 sauvages et transgéniques, nous pourrions déterminer si la Nrp-1 dans la population des LT CD8⁺ contribue à l'épuisement de ces cellules.

III. La Nrp-1 joue un rôle dans la régulation des fonctions effectrices des LT CD8⁺

Nous avons mis en évidence que la Nrp-1 participe à la régulation des fonctions effectrices et à la migration des TILs CD8⁺. En effet, lorsque nous bloquons ce récepteur à l'aide d'un anticorps neutralisant, nous restaurons la capacité des TILs CD8⁺ à migrer, et à tuer les cellules tumorales autologues *ex vivo*. La plupart des iRs régule les fonctions effectrices des LT CD8⁺ par recrutement de phosphatases au niveau de leur motif ITIM ou ITSM situé dans leur domaine intracellulaire (Wherry and Kurachi 2015). Ceci provoque la régulation de voies de signalisation, telles que PI3K ou AKT, et inhibe les fonctions effectrices des LT CD8⁺. Pour la Nrp-1, peu est connu à ce jour sur les mécanismes utilisés par ce récepteur pour inhiber les fonctions effectrices de cette population immunitaire. Cependant, la Nrp-1 contient un court domaine cytoplasmique qui ne peut à lui seul transduire une signalisation intracellulaire. La Nrp-1 doit être associée à un co-récepteur, tels que les PLXN de type A ou les VEGFR, pour pouvoir induire une signalisation. Nous n'avons pas observé de co-expression de VEGFR1 et VEGFR2 avec la Nrp-1 sur les TILs CD8⁺ murins et humains. Nous avons observé cependant, au niveau transcriptionnel, une expression de différentes PLXN-A, en particulier les PLXN-A2 et PLXN-A1. De plus, une forte expression du transcrits de la Sema-3B a été retrouvée dans les tumeurs murines, alors que dans les tumeurs humaines la Sema-3A est fortement exprimée au niveau transcriptionnel et protéique. Nous émettons l'hypothèse que l'effet inhibiteur induit par la Nrp-1 pour les LT CD8⁺ est transmis grâce au co-récepteur de type PLXN-A, et à la liaison d'un ligand appartenant à la famille des Sema-3, en particulier la Sema-3B ou la Sema-3A. Néanmoins cela doit être confirmé. Il faudra déterminer quelles cellules dans le contexte tumoral expriment le ligand de la Nrp-1, et définir avec certitude le ou les ligands impliqués dans ces effets inhibiteurs. L'effet inhibiteur de la Nrp-1 sur la migration et l'activité cytotoxique des LT CD8⁺, peut être expliqué par le fait que la liaison d'une Sema-3, peut induire une désorganisation du cytosquelette d'actine, et par conséquent bloquer ces 2 mécanismes : la migration et le relargage des GC. En effet, dans le système nerveux la Nrp-1 a un rôle important pour la migration. Lorsque le ligand, une Sema-3, se fixe sur la Nrp-1, une signalisation intracellulaire est induite par une PLXN-A, grâce à l'activation de GTPases

appartenant à la famille des protéines Rho. Cela va provoquer des modifications au niveau de l'assemblage de l'actine, entraînant alors un changement de conformation du réseau d'actine. Un changement directionnel va alors être provoqué, et plus particulièrement une chimioréulsion des neurones (Kruger, Aurandt et al. 2005). Toutefois dans certains cas, les Sema-3 peuvent avoir une action attractive due à une forte activité des cGMP intracellulaires (Song, Ming et al. 1998; Polleux, Morrow et al. 2000). Cet effet des Sema-3 sur le cytosquelette d'actine a aussi été mis en évidence dans la régulation de la prolifération de LT CD8⁺ issus du sang périphérique de donneurs sains. La Sema-3A engendre une désorganisation du cytosquelette d'actine et inhibe ainsi la prolifération des LT CD8⁺. Cependant il n'a pas été démontré que ces cellules expriment la Nrp-1 à leur surface (Lepelletier, Moura et al. 2006). La Sema-3A peut aussi altérer la signalisation du TCR et par conséquent la fonction des LT (Catalano, Caprari et al. 2006), mais encore une fois, il n'a pas été mis clairement en évidence que cet effet est causé par le récepteur Nrp-1. De plus, des LT non activés ont été utilisés pour cette étude, alors que l'état d'activation semble être crucial pour l'expression membranaire de la Nrp-1 sur les LT. Il faudrait donc déterminer si l'effet inhibiteur de la Nrp-1 sur les TILs CD8⁺ est bien provoqué par une Sema-3, et si cela conduit à une désorganisation du cytosquelette d'actine. Pour cela, l'identification précise du co-récepteur de la Nrp-1 est essentielle.

IV. Cibler la Nrp-1 et combinaison d'immunothérapies

Nous avons mis en évidence que l'anticorps bloquant anti-Nrp-1 agit en synergie avec l'anticorps anti-PD-1 pour l'effet antitumoral *in vivo*. L'immunothérapie utilisant des anticorps bloquants a révolutionné ces dernières années le traitement des patients atteints de cancers. Ces traitements aident le système immunitaire à reconnaître et à éliminer les cellules tumorales. Malheureusement, seule une population des patients répond à ces traitements. Il est donc crucial de caractériser l'influence d'autres facteurs moléculaires régulant la migration et les activités fonctionnelles des LT CD8⁺ afin d'améliorer les traitements actuels du cancer. La Nrp-1 semble donc être intéressante comme cible immunothérapeutique. Il existe de nos jours beaucoup d'outils pour cibler et inhiber la Nrp-1, qui sont en développement pré-clinique; administration de Nrp-1 soluble (joue le rôle de récepteur leurre), Acm neutralisant anti-Nrp-1, peptides solubles empêchant l'interaction entre la Nrp-1 et ses ligands (Graziani and Lacal 2015). Cependant, ces traitements peuvent induire de nombreux effets secondaires. En effet, comme la Nrp-1 est essentielle dans de nombreux processus physiologiques et qu'elle est exprimée par un large répertoire de cellules (cellules neuronales et cellules endothéliales en particulier), l'administration de drogues ciblant ce récepteur peut avoir pour conséquence de nombreuses toxicités *off-target*. Il va donc être important d'améliorer les voies d'administration et cibler uniquement l'interaction Nrp-1/ligand désirée, pour minimiser les toxicités

et ainsi pouvoir cibler la Nrp-1 dans le traitement du cancer. Une étude clinique de phase 1 avec un Acm anti-Nrp-1 (MNRP1685A), administré en intraveineux et bloquant spécifiquement l'interaction avec le VEGF, a été effectuée sur une cohorte de patients atteints de tumeurs solides localement avancées ou métastatiques (Weekes, Beeram et al. 2014). Globalement l'anticorps a été assez bien toléré par les patients. Cependant, lorsque cet anticorps a été administré en combinaison avec du bevacizumab (Acm anti-VEGF) ou du paclitaxel (molécule inhibant le fuseau mitotique), un taux plus élevé que prévu de protéinurie a été observé, ce qui a engendré l'arrêt de l'essai clinique de ces combinaisons de traitements (Patnaik, LoRusso et al. 2014). Il faudra encore plus de recherche permettant d'identifier des molécules ciblant plus efficacement la Nrp-1 avec un minimum d'effets secondaires.

Actuellement, des essais cliniques basés sur des combinaisons de différents anticorps antagonistes ou agonistes sont en cours pour identifier le meilleur traitement anticancéreux (Popovic, Jaffee et al. 2018). La raison pour bloquer plusieurs iRs et/ou activer de nombreux récepteurs co-activateurs simultanément est rationnelle, car bien que tous ces récepteurs soient exprimés sur les LT CD8⁺, ils possèdent des mécanismes différents pour inhiber ou activer les fonctions effectrices de ces cellules. La compréhension des différents états d'épuisement, ainsi que la cinétique d'expression de chaque iRs et aRs, permettra de trouver le meilleur moyen de restaurer les fonctions effectrices des LT CD8⁺ engendrant ainsi une réponse antitumorale optimale.

L'effet synergique du traitement de l'Acm anti-Nrp-1 combiné à l'anti-PD-1 *in vivo* suggère que ces deux récepteurs ont des voies d'inhibition différentes. Cependant, il n'a pas été observé d'effets cumulatifs de cette combinaison de traitements sur la fonction cytotoxique des TIL CD8⁺ *ex vivo*. Néanmoins, uniquement l'Acm anti-Nrp-1 augmente la migration des TIL CD8⁺ vers la cellule tumorale autologue *ex vivo*, qui pourrait alors expliquer l'effet synergique *in vivo*. Une deuxième explication peut être le fait que l'Acm anti-Nrp-1 affecte aussi la population de Treg. En effet, il a été montré que l'utilisation de l'Acm anti-Nrp-1 *in vivo* ralentissait la croissance tumorale, et que cet effet était associé au fait que la population de Treg était négativement impactée et ne pouvait donc plus exercer sa fonction immunosuppressive (Delgoffe, Woo et al. 2013). En effet, il ne faut pas oublier que le ciblage des iRs ou des aRs n'affecte pas uniquement les LT CD8⁺. Ces traitements ont aussi des effets sur d'autres populations immunitaires présentes au site tumoral car ces récepteurs ne sont pas spécifiques aux LT CD8⁺, et ils peuvent être exprimés sur d'autres cellules, telles que les Treg, les LT CD4⁺, les macrophages ou encore les DC (Mahoney, Rennert et al. 2015; Joller and Kuchroo 2017). Les effets de ces anticorps agonistes ou antagonistes sont pour l'instant peu étudiés sur ces différentes populations cellulaires. Il faudrait donc tenir compte de la possibilité d'induire des

effets sur d'autres sous-ensembles de cellules immunitaires et la capacité de ces immunothérapies de promouvoir l'auto-immunité ou des réponses immunopathologiques locales.

V. Importance des molécules neuronales dans le système immunitaire

Nous avons mis en évidence que la Nrp-1, molécule initialement identifiée dans le système nerveux, peut aussi jouer un rôle important dans le contrôle de la fonctionnalité des LT CD8⁺. Depuis quelques années, l'étude de la Nrp-1 dans le système immunitaire s'est développée. À ce jour, il est connu que de nombreuses cellules immunitaires, telles que les cellules Tregs, les pDC, ou encore les macrophages expriment la Nrp-1 à leur surface (Roy, Bag et al. 2017). Cependant, le rôle précis de ce récepteur sur ces populations est encore en partie inconnu. Il a été mis en évidence que de nombreuses molécules du système nerveux jouent aussi un rôle important dans le système immunitaire, et inversement. Bien qu'à première vue, il semble ne pas y avoir de lien entre le système nerveux et le système immunitaire, ces deux systèmes se ressemblent plus qu'il n'y paraît. Il existe de nombreuses similarités entre les cellules nerveuses (neurones) et les cellules immunitaires (lymphocytes). Leur nombre est considérable (10^{10} neurones et environ 10^{12} lymphocytes chez l'homme), et ces deux types cellulaires sont dotés de mémoire (Habibi, Ebtekar et al. 2009; Kioussis and Pachnis 2009). Ainsi, il n'est pas étonnant de retrouver des protéines impliquées dans la guidance axonale, telles que les éphrines, les nétrines et les sémaphorines, au sein du système immunitaire (Linden 2011; Funk and Orr 2013; Feinstein and Ramkhelawon 2017). À l'heure actuelle, il est important d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires régulant la migration et/ou les fonctions effectrices des LT CD8⁺ ce qui constitue un enjeu majeur pour améliorer les thérapies anticancéreuses actuelles. De ce fait, s'intéresser à ces molécules neuronales pourrait permettre de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Il est connu que ces molécules influencent particulièrement la migration des cellules neuronales (Bashaw and Klein 2010). Il serait donc intéressant de savoir si ces familles de récepteurs/ligands peuvent aussi moduler la migration ou le recrutement des LT CD8⁺ au site tumoral, ainsi que leurs fonctions effectrices. Quelques études ont déjà mis en évidence le rôle de certaines de ces molécules neuronales dans la migration et/ou la fonction des LT CD8⁺. Ainsi, la Sema-4A, grâce au récepteur PLXN-B2, joue un rôle dans l'activation optimale et la différenciation des LT CD8⁺ (Ito, Nojima et al. 2015), alors que l'éphrine-A1 quant à elle module la migration de ces cellules (Hjorthaug and Aasheim 2007). Il serait intéressant de déterminer si ces deux molécules peuvent jouer un rôle similaire dans un contexte tumoral, pour permettre ensuite leur utilisation comme cibles thérapeutiques.

Contrairement à la Nrp-1, la Nrp-2 a été très peu étudiée dans le système immunitaire (Roy, Bag et al. 2017). À ce jour, il n'est pas connu si ce récepteur est exprimé par les LT CD4⁺ ou CD8⁺. Bien que

les voies de signalisation de la Nrp-1 et de la Nrp-2 soient largement distinctes, elles sont capables de se compenser partiellement dans certains contextes biologiques en fonction des ligands impliqués (Takashima, Kitakaze et al. 2002). Comme nous observons une expression assez faible de la Nrp-1 sur les TILs CD8⁺ provenant des tumeurs pulmonaires humaines, l'étude de l'expression de la Nrp-2 permettra de répondre à la question si cette faible expression peut être compensée par celle de la Nrp-2.

CONCLUSION

La présence d'un infiltrat immunitaire constitué principalement de LT CD8⁺ est souvent de bon pronostic pour les patients atteints de cancers (Galon, Costes et al. 2006). Cependant, au cours du processus tumoral, les LT CD8⁺ spécifiques de la tumeur s'épuisent et perdent leur capacité cytotoxique, provoquant l'échappement au système immunitaire (Spranger 2016). Cet épuisement est accompagné d'une augmentation de l'expression d'iRs, tels que PD-1 et CTLA-4, à la surface des LT CD8⁺, jouant un rôle dans la perte de leurs fonctions effectrices (Wherry and Kurachi 2015). De ce fait, les traitements antitumoraux ont largement évolué ces dernières années. Le développement d'immunothérapies utilisant des anticorps ciblant PD-1 et CTLA-4 a grandement révolutionné le traitement des patients atteints de cancers. Ces anticorps bloquants sont utilisés dans de nombreux cancers, et ont montré leur efficacité chez les patients atteints de mélanome, de cancer rénal, de lymphome hodgkinien ou encore les CBNPC (Ott, Hodi et al. 2013). Néanmoins, de nombreux patients ne répondent pas à ces nouveaux traitements. Il est donc primordial de mieux caractériser la réponse antitumorale exercée par les LT CD8⁺ afin de l'optimiser et d'améliorer les approches immunothérapeutiques actuelles. De ce fait, identifier de nouveaux acteurs moléculaires régulant la migration et/ou les fonctions effectrices des LT CD8⁺ constitue un enjeu majeur dans le développement de nouvelles thérapies.

Dans ce contexte, l'objectif majeur de cette étude était d'identifier un nouvel acteur régulant les fonctions effectrices des LT CD8⁺ dans l'environnement tumoral, pour permettre une meilleure compréhension des facteurs jouant un rôle dans la régulation des fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺ afin d'optimiser la réponse antitumorale. Récemment, il a été montré qu'une fraction de LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs exprime la Nrp-1 chez des patients atteints de mélanome métastatique en comparaison avec les LT CD8⁺ provenant du sang périphérique de donneurs sains (Jackson, Berrien-Elliott et al. 2014). Néanmoins, il n'est pas connu si l'expression de la Nrp-1 corrèle avec celles de différents iRs tels que CTLA-4 et PD-1 et/ou le statut dysfonctionnel, et si ce récepteur contribue à la régulation négative des fonctions effectrices des LT CD8⁺. Il a été montré dans un modèle murin d'infection chronique et de cancer que la Nrp-1 est l'un des gènes les plus régulés positivement dans les LT CD8⁺ épuisées (Wherry, Ha et al. 2007; Schietinger, Philip et al. 2016). Dans ce contexte, nous avons étudié l'expression de la Nrp-1 sur la population de LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs et déterminé le rôle de ce récepteur dans cette population immunitaire.

Mes travaux ont montré que dans les CBNPC humains, une sous population de TILs CD8⁺ exprime la Nrp-1 contrairement aux LT CD8⁺ provenant du sang périphérique des patients et des donneurs sains. La Nrp-1 est induite sur les LT CD8⁺ et CD4⁺ conventionnels après engagement du TCR, et peut

être induite *in vitro* par activation avec un Acm anti-CD3. De plus, la Sema-3A affecte la migration et la fonction cytotoxique des LT *in vitro*.

Ensuite, j'ai identifié un sous-ensemble beaucoup plus important de LT CD8⁺ infiltrant le mélanome B16F10 greffé en sous-cutanée sur des souris C57BL/6, qui exprime des niveaux élevés de la Nrp-1. J'ai montré que la présence de cette population augmente pendant la croissance tumorale, mais reste indétectable dans les organes lymphoïdes (rate et ganglion lymphatique drainant la tumeur). J'ai mis en évidence par la suite que l'expression de la Nrp-1 sur les TILs CD8⁺ est indissociable à une forte expression de PD-1. Avec ces deux récepteurs, 3 populations de TILs CD8⁺ ont pu être définies : Nrp-1⁻ PD-1⁻, Nrp-1⁻ PD-1⁺, et Nrp-1⁺ PD-1^{hi}. Nous avons caractérisé phénotypiquement ces 3 populations de TILs CD8⁺, notamment pour déterminer leur état d'activation et/ou d'épuisement, et leur spécificité à la tumeur. Les TILs CD8⁺ Nrp-1⁺ PD-1^{hi} sont enrichis en cellules spécifiques de la tumeur, et présentent des caractéristiques d'épuisement, en particulier une forte expression d'iRs (LAG-3, CTLA-4, Tim-3), une diminution de production du TNF- α , et une expression plus importante de facteurs de transcription impliqués dans l'épuisement (T-bet, BLIMP-1, NFATc1, etc.). Il est important de noter que le blocage de la Nrp-1 avec un Acm neutralisant a permis d'augmenter la capacité des TILs CD8⁺ à migrer vers les cellules tumorales. De plus, ce blocage a également amélioré l'activité cytotoxique des TILs CD8⁺ envers les cellules tumorales autologues *ex vivo*. De manière intéressante, l'inhibition de la Nrp-1 *in vivo* agit en synergie avec la neutralisation du récepteur PD-1 dans le contrôle de la croissance tumorale et l'optimisation des fonctions effectrices des LT CD8⁺ (**Figure 18**).

Ainsi, la Nrp-1 peut correspondre à un nouveau « checkpoint » immunitaire régulant les fonctions des LT CD8⁺ antitumoraux dans l'écosystème tumoral. Il serait intéressant par la suite de comprendre les mécanismes moléculaires de la Nrp-1 impliqués dans la régulation des capacités migratoire et de l'activité cytotoxique des CTLs spécifiques des tumeurs, *in vitro* et *in vivo*.

Mes résultats montrent donc comment le microenvironnement tumoral induit l'expression de la Nrp-1 sur les LT CD8⁺ et comment ce récepteur neuronal peut participer à la régulation des fonctions effectrices des LT CD8⁺ antitumoraux, avec de potentielles implications comme cible immunothérapeutique.

Production de cytokines et potentiel cytotoxique :

IFN γ +++
TNF α +/-
GzmB ++
CD107a ++

Potentiel prolifératif :

Ki-67 ++

Cellule spécifique des antigènes tumoraux:

+++

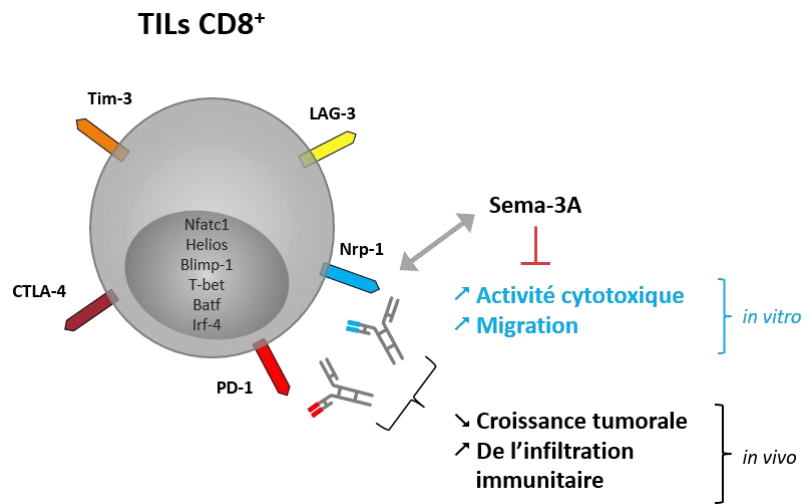


Figure 18 : Schéma récapitulatif de l'expression et du rôle de la Nrp-1 sur les lymphocytes T CD8⁺ antitumoraux

BIBLIOGRAPHIE

- (1999). "Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee." *Cell* **97**(5): 551-552.
- Agnellini, P., P. Wolint, et al. (2007). "Impaired NFAT nuclear translocation results in split exhaustion of virus-specific CD8+ T cell functions during chronic viral infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11): 4565-4570.
- Alitalo, K. and P. Carmeliet (2002). "Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease." *Cancer Cell* **1**(3): 219-227.
- Allard, B., S. Pommey, et al. (2013). "Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs." *Clin Cancer Res* **19**(20): 5626-5635.
- Allison, J. P. and M. F. Krummel (1995). "The Yin and Yang of T cell costimulation." *Science* **270**(5238): 932-933.
- Anderson, A. C., G. M. Lord, et al. (2010). "T-bet, a Th1 transcription factor regulates the expression of Tim-3." *Eur J Immunol* **40**(3): 859-866.
- Angelosanto, J. M., S. D. Blackburn, et al. (2012). "Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection." *J Virol* **86**(15): 8161-8170.
- Antipenko, A., J. P. Himanen, et al. (2003). "Structure of the semaphorin-3A receptor binding module." *Neuron* **39**(4): 589-598.
- Araki, K., A. P. Turner, et al. (2009). "mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation." *Nature* **460**(7251): 108-112.
- Arce Vargas, F., A. J. S. Furness, et al. (2018). "Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies." *Cancer Cell* **33**(4): 649-663 e644.
- Asakura, H., Y. Kashio, et al. (2002). "Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9." *J Immunol* **169**(10): 5912-5918.
- Ashikari-Hada, S., H. Habuchi, et al. (2005). "Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins." *J Biol Chem* **280**(36): 31508-31515.
- Aung, N. Y., R. Ohe, et al. (2016). "Specific Neuropilins Expression in Alveolar Macrophages among Tissue-Specific Macrophages." *PLoS One* **11**(2): e0147358.
- Azuma, M., D. Ito, et al. (1993). "B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28." *Nature* **366**(6450): 76-79.
- Bae, J., S. J. Lee, et al. (2014). "Trafficking of LAG-3 to the surface on activated T cells via its cytoplasmic domain and protein kinase C signaling." *J Immunol* **193**(6): 3101-3112.
- Baitsch, L., P. Baumgaertner, et al. (2011). "Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients." *J Clin Invest* **121**(6): 2350-2360.
- Baixeras, E., B. Huard, et al. (1992). "Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens." *J Exp Med* **176**(2): 327-337.
- Bakker, A. B., M. W. Schreurs, et al. (1995). "Identification of a novel peptide derived from the melanocyte-specific gp100 antigen as the dominant epitope recognized by an HLA-A2.1-restricted anti-melanoma CTL line." *Int J Cancer* **62**(1): 97-102.
- Ball, S. G., C. Bayley, et al. (2010). "Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells." *Biochem J* **427**(1): 29-40.
- Banerjee, A., S. M. Gordon, et al. (2010). "Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche." *J Immunol* **185**(9): 4988-4992.
- Banerjee, S., K. Sengupta, et al. (2006). "Breast cancer cells secreted platelet-derived growth factor-induced motility of vascular smooth muscle cells is mediated through neuropilin-1." *Mol Carcinog* **45**(11): 871-880.
- Bansal-Pakala, P., B. S. Halteman, et al. (2004). "Costimulation of CD8 T cell responses by OX40." *J*

- Immunol **172**(8): 4821-4825.
- Bartkowiak, T. and M. A. Curran (2015). "4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity." Front Oncol **5**: 117.
- Bashaw, G. J. and R. Klein (2010). "Signaling from axon guidance receptors." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a001941.
- Battaglia, A., A. Buzzonetti, et al. (2008). "Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer." Immunology **123**(1): 129-138.
- Bedognetti, D., T. L. Spivey, et al. (2013). "CXCR3/CCR5 pathways in metastatic melanoma patients treated with adoptive therapy and interleukin-2." Br J Cancer **109**(9): 2412-2423.
- Benchetrit, F., A. Gazagne, et al. (2003). "[Cytotoxic T lymphocytes: role in immunosurveillance and in immunotherapy]." Bull Cancer **90**(8-9): 677-685.
- Bensch, B., A. L. Johnson, et al. (2016). "Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion." Immunity **45**(2): 358-373.
- Bensch, B., T. Ohtani, et al. (2018). "Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells." Immunity **48**(5): 1029-1045 e1025.
- Bertrand, F., A. Montfort, et al. (2017). "TNFalpha blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma." Nat Commun **8**(1): 2256.
- Bielenberg, D. R., A. Shimizu, et al. (2008). "Semaphorin-induced cytoskeletal collapse and repulsion of endothelial cells." Methods Enzymol **443**: 299-314.
- Blackburn, S. D., H. Shin, et al. (2008). "Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15016-15021.
- Blackburn, S. D., H. Shin, et al. (2009). "Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection." Nat Immunol **10**(1): 29-37.
- Bloch-Queyrat, C., M. C. Fondaneche, et al. (2005). "Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn." J Exp Med **202**(1): 181-192.
- Boettler, T., Y. Cheng, et al. (2012). "TGF-beta blockade does not improve control of an established persistent viral infection." Viral Immunol **25**(3): 232-238.
- Brooks, D. G., S. J. Ha, et al. (2008). "IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20428-20433.
- Brooks, D. G., D. B. McGavern, et al. (2006). "Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection." J Clin Invest **116**(6): 1675-1685.
- Brooks, D. G., M. J. Trifilo, et al. (2006). "Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo." Nat Med **12**(11): 1301-1309.
- Brown, M. H., K. Boles, et al. (1998). "2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48." J Exp Med **188**(11): 2083-2090.
- Bucks, C. M., J. A. Norton, et al. (2009). "Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8+ T cell exhaustion." J Immunol **182**(11): 6697-6708.
- Buggert, M., J. Tauriainen, et al. (2014). "T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection." PLoS Pathog **10**(7): e1004251.
- Bulliard, Y., R. Jolicoeur, et al. (2014). "OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcgammaRs, leading to antitumor efficacy." Immunol Cell Biol **92**(6): 475-480.
- Burdelya, L., M. Kujawski, et al. (2005). "Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects." J Immunol **174**(7): 3925-3931.
- Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." Br Med J **1**(5022): 779-786.
- Cackowski, F. C., L. Xu, et al. (2004). "Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms." Genomics **84**(1): 82-94.
- Cai, G., A. Anumanthan, et al. (2008). "CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator." Nat Immunol **9**(2): 176-185.

- Calzascia, T., M. Pellegrini, et al. (2007). "TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice." *J Clin Invest* **117**(12): 3833-3845.
- Cannons, J. L., P. Lau, et al. (2001). "4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy." *J Immunol* **167**(3): 1313-1324.
- Cao, X., S. F. Cai, et al. (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." *Immunity* **27**(4): 635-646.
- Capece, D., D. Verzella, et al. (2012). "Targeting costimulatory molecules to improve antitumor immunity." *J Biomed Biotechnol* **2012**: 926321.
- Casazza, A., P. Fazzari, et al. (2007). "Semaphorin signals in cell adhesion and cell migration: functional role and molecular mechanisms." *Adv Exp Med Biol* **600**: 90-108.
- Casazza, A., D. Laoui, et al. (2013). "Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity." *Cancer Cell* **24**(6): 695-709.
- Catalano, A., P. Caprari, et al. (2006). "Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function." *Blood* **107**(8): 3321-3329.
- Cekic, C. and J. Linden (2014). "Adenosine A2A receptors intrinsically regulate CD8+ T cells in the tumor microenvironment." *Cancer Res* **74**(24): 7239-7249.
- Chaudhary, B. and E. Elkord (2015). "Novel expression of Neuropilin 1 on human tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer liver metastases." *Expert Opin Ther Targets* **19**(2): 147-161.
- Chaudhary, B., Y. S. Khaled, et al. (2014). "Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer." *Cancer Immunol Immunother* **63**(2): 81-99.
- Chaudhry, A., R. M. Samstein, et al. (2011). "Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation." *Immunity* **34**(4): 566-578.
- Chemnitz, J. M., R. V. Parry, et al. (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." *J Immunol* **173**(2): 945-954.
- Chen, G., A. C. Huang, et al. (2018). "Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response." *Nature* **560**(7718): 382-386.
- Chen, H., Z. He, et al. (1998). "Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins." *Neuron* **21**(6): 1283-1290.
- Chen, L. and D. B. Flies (2013). "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition." *Nat Rev Immunol* **13**(4): 227-242.
- Chen, S., L. F. Lee, et al. (2015). "Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model." *Cancer Immunol Res* **3**(2): 149-160.
- Chevalier, M. F., B. Julg, et al. (2011). "HIV-1-specific interleukin-21+ CD4+ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8+ T cell function." *J Virol* **85**(2): 733-741.
- Chiba, S., M. Baghdadi, et al. (2012). "Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1." *Nat Immunol* **13**(9): 832-842.
- Chinnasamy, N., J. A. Wargo, et al. (2011). "A TCR targeting the HLA-A*0201-restricted epitope of MAGE-A3 recognizes multiple epitopes of the MAGE-A antigen superfamily in several types of cancer." *J Immunol* **186**(2): 685-696.
- Chiu, Y. L., L. Shan, et al. (2014). "Sprouty-2 regulates HIV-specific T cell polyfunctionality." *J Clin Invest* **124**(1): 198-208.
- Chlewicki, L. K., C. A. Velikovskiy, et al. (2008). "Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244)." *J Immunol* **180**(12): 8159-8167.
- Chowdhury, D. and J. Lieberman (2008). "Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death." *Annu Rev Immunol* **26**: 389-420.
- Clayton, K. L., M. S. Haaland, et al. (2014). "T cell Ig and mucin domain-containing protein 3 is recruited to the immune synapse, disrupts stable synapse formation, and associates with

- receptor phosphatases." *J Immunol* **192**(2): 782-791.
- Collison, L. W., C. J. Workman, et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature* **450**(7169): 566-569.
- Corbel, C., V. Lemarchandel, et al. (2007). "Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation." *Dev Comp Immunol* **31**(11): 1082-1094.
- Crawford, A., J. M. Angelosanto, et al. (2014). "Molecular and transcriptional basis of CD4(+) T cell dysfunction during chronic infection." *Immunity* **40**(2): 289-302.
- Croft, M. (2010). "Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134)." *Annu Rev Immunol* **28**: 57-78.
- Curtsinger, J. M. and M. F. Mescher (2010). "Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation." *Curr Opin Immunol* **22**(3): 333-340.
- de Paulis, A., N. Prevede, et al. (2006). "Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils." *J Immunol* **177**(10): 7322-7331.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *J Exp Med* **204**(6): 1257-1265.
- Dejda, A., G. Mawambo, et al. (2016). "Neuropilin-1-Expressing Microglia Are Associated With Nascent Retinal Vasculature Yet Dispensable for Developmental Angiogenesis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**(4): 1530-1536.
- Delgoffe, G. M., T. P. Kole, et al. (2009). "The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment." *Immunity* **30**(6): 832-844.
- Delgoffe, G. M., S. R. Woo, et al. (2013). "Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis." *Nature* **501**(7466): 252-256.
- Demaria, S., N. Kawashima, et al. (2005). "Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer." *Clin Cancer Res* **11**(2 Pt 1): 728-734.
- Derynck, R., R. J. Akhurst, et al. (2001). "TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression." *Nat Genet* **29**(2): 117-129.
- Dewan, M. Z., A. E. Galloway, et al. (2009). "Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody." *Clin Cancer Res* **15**(17): 5379-5388.
- Dhar, K., G. Dhar, et al. (2010). "Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1." *Mol Cancer* **9**: 209.
- Doedens, A. L., A. T. Phan, et al. (2013). "Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen." *Nat Immunol* **14**(11): 1173-1182.
- Doering, T. A., A. Crawford, et al. (2012). "Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory." *Immunity* **37**(6): 1130-1144.
- Dong, C., A. E. Juedes, et al. (2001). "ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function." *Nature* **409**(6816): 97-101.
- Dorothee, G., I. Vergnon, et al. (2002). "Tumor-infiltrating CD4+ T lymphocytes express APO2 ligand (APO2L)/TRAIL upon specific stimulation with autologous lung carcinoma cells: role of IFN-alpha on APO2L/TRAIL expression and -mediated cytotoxicity." *J Immunol* **169**(2): 809-817.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-998.
- Dustin, M. L., S. K. Bromley, et al. (1997). "Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3909-3913.
- Dzionic, A., A. Fuchs, et al. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." *J Immunol* **165**(11): 6037-6046.
- Dzionic, A., Y. Inagaki, et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions." *Hum Immunol* **63**(12): 1133-1148.
- Echchakir, H., I. Vergnon, et al. (2000). "Evidence for in situ expansion of diverse antitumor-specific cytotoxic T lymphocyte clones in a human large cell carcinoma of the lung." *Int Immunol*

- 12(4):** 537-546.
- Eissmann, P., L. Beauchamp, et al. (2005). "Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244)." *Blood* **105**(12): 4722-4729.
- Ejrnaes, M., C. M. Filippi, et al. (2006). "Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade." *J Exp Med* **203**(11): 2461-2472.
- Elsaesser, H., K. Sauer, et al. (2009). "IL-21 is required to control chronic viral infection." *Science* **324**(5934): 1569-1572.
- Fan, X., S. A. Quezada, et al. (2014). "Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy." *J Exp Med* **211**(4): 715-725.
- Fantin, A., J. M. Vieira, et al. (2010). "Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction." *Blood* **116**(5): 829-840.
- Feinstein, J. and B. Ramkhalawon (2017). "Netrins & Semaphorins: Novel regulators of the immune response." *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**(12): 3183-3189.
- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* **9**(6): 669-676.
- Finotello, F. and Z. Trajanoski (2017). "New strategies for cancer immunotherapy: targeting regulatory T cells." *Genome Med* **9**(1): 10.
- Fisk, B., T. L. Blevins, et al. (1995). "Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines." *J Exp Med* **181**(6): 2109-2117.
- Foley, E. J. (1953). "Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin." *Cancer Res* **13**(12): 835-837.
- Fourcade, J., Z. Sun, et al. (2010). "Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients." *J Exp Med* **207**(10): 2175-2186.
- Freeman, G. J., J. M. Casasnovas, et al. (2010). "TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity." *Immunol Rev* **235**(1): 172-189.
- Freeman, G. J., J. G. Gribben, et al. (1993). "Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation." *Science* **262**(5135): 909-911.
- Freeman, G. J., A. J. Long, et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." *J Exp Med* **192**(7): 1027-1034.
- Freeman, G. J., E. J. Wherry, et al. (2006). "Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade." *J Exp Med* **203**(10): 2223-2227.
- Frohlich, A., J. Kisielow, et al. (2009). "IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection." *Science* **324**(5934): 1576-1580.
- Fuh, G., K. C. Garcia, et al. (2000). "The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1." *J Biol Chem* **275**(35): 26690-26695.
- Fujisawa, H. (2004). "Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development." *J Neurobiol* **59**(1): 24-33.
- Fujisawa, H., T. Kitsukawa, et al. (1997). "Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance." *Cell Tissue Res* **290**(2): 465-470.
- Fujisawa, H., S. Takagi, et al. (1995). "Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers." *Dev Neurosci* **17**(5-6): 343-349.
- Funk, S. D. and A. W. Orr (2013). "Ephs and ephrins resurface in inflammation, immunity, and atherosclerosis." *Pharmacol Res* **67**(1): 42-52.
- Gabrilovich, D. I., V. Bronte, et al. (2007). "The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells." *Cancer Res* **67**(1): 425; author reply 426.
- Gagnon, M. L., D. R. Bielenberg, et al. (2000). "Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2573-2578.

- Gajewski, T. F., H. Schreiber, et al. (2013). "Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment." *Nat Immunol* **14**(10): 1014-1022.
- Gallimore, A., A. Glithero, et al. (1998). "Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes." *J Exp Med* **187**(9): 1383-1393.
- Galon, J., A. Costes, et al. (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." *Science* **313**(5795): 1960-1964.
- Garcia, F., Y. Lepelletier, et al. (2012). "Inhibitory effect of semaphorin-3A, a known axon guidance molecule, in the human thymocyte migration induced by CXCL12." *J Leukoc Biol* **91**(1): 7-13.
- Garidou, L., S. Heydari, et al. (2012). "Therapeutic blockade of transforming growth factor beta fails to promote clearance of a persistent viral infection." *J Virol* **86**(13): 7060-7071.
- Garni-Wagner, B. A., A. Purohit, et al. (1993). "A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells." *J Immunol* **151**(1): 60-70.
- Ghez, D., Y. Lepelletier, et al. (2006). "Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry." *J Virol* **80**(14): 6844-6854.
- Ghiotto, M., L. Gauthier, et al. (2010). "PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1." *Int Immunol* **22**(8): 651-660.
- Gibson, H. M., C. J. Hedgcock, et al. (2007). "Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter." *J Immunol* **179**(6): 3831-3840.
- Glimcher, L. H., M. J. Townsend, et al. (2004). "Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells." *Nat Rev Immunol* **4**(11): 900-911.
- Glinka, Y. and G. J. Prud'homme (2008). "Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity." *J Leukoc Biol* **84**(1): 302-310.
- Glinka, Y., S. Stoilova, et al. (2011). "Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta." *Carcinogenesis* **32**(4): 613-621.
- Gluzman-Poltorak, Z., T. Cohen, et al. (2000). "Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]." *J Biol Chem* **275**(24): 18040-18045.
- Godefroy, E., H. Zhong, et al. (2015). "TIGIT-positive circulating follicular helper T cells display robust B-cell help functions: potential role in sickle cell alloimmunization." *Haematologica* **100**(11): 1415-1425.
- Goh, C., S. Narayanan, et al. (2013). "Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections?" *Immunol Rev* **255**(1): 210-221.
- Gomi, T., A. Kimura, et al. (1991). "Electron-microscopic observations of the alveolar brush cell of the rat." *Acta Anat (Basel)* **141**(4): 294-301.
- Gonzalez, L. C., K. M. Loyet, et al. (2005). "A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(4): 1116-1121.
- Good-Jacobson, K. L., C. G. Szumilas, et al. (2010). "PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells." *Nat Immunol* **11**(6): 535-542.
- Gopalakrishnan, V., B. A. Helmink, et al. (2018). "The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy." *Cancer Cell* **33**(4): 570-580.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2001). "Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells." *Nat Med* **7**(10): 1118-1122.
- Grage-Griebenow, E., S. Loseke, et al. (2007). "Anti-BDCA-4 (neuropilin-1) antibody can suppress virus-induced IFN-alpha production of plasmacytoid dendritic cells." *Immunol Cell Biol* **85**(5): 383-390.
- Graziani, G. and P. M. Lical (2015). "Neuropilin-1 as Therapeutic Target for Malignant Melanoma." *Front Oncol* **5**: 125.

- Groom, J. R. and A. D. Luster (2011). "CXCR3 in T cell function." *Exp Cell Res* **317**(5): 620-631.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." *Immunity* **21**(4): 589-601.
- Grun, D., G. Adhikary, et al. (2016). "VEGF-A acts via neuropilin-1 to enhance epidermal cancer stem cell survival and formation of aggressive and highly vascularized tumors." *Oncogene* **35**(33): 4379-4387.
- Gu, C., E. R. Rodriguez, et al. (2003). "Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development." *Dev Cell* **5**(1): 45-57.
- Gubin, M. M., X. Zhang, et al. (2014). "Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens." *Nature* **515**(7528): 577-581.
- Habibi, L., M. Ebtekar, et al. (2009). "Immune and nervous systems share molecular and functional similarities: memory storage mechanism." *Scand J Immunol* **69**(4): 291-301.
- Han, P., O. D. Goularte, et al. (2004). "An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection." *J Immunol* **172**(10): 5931-5939.
- Hannier, S., M. Tournier, et al. (1998). "CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling." *J Immunol* **161**(8): 4058-4065.
- Hansen, W., M. Hutzler, et al. (2012). "Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth." *J Exp Med* **209**(11): 2001-2016.
- Harlin, H., Y. Meng, et al. (2009). "Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment." *Cancer Res* **69**(7): 3077-3085.
- Hathcock, K. S., G. Laszlo, et al. (1993). "Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation." *Science* **262**(5135): 905-907.
- Hayashi, M., T. Nakashima, et al. (2012). "Osteoprotection by semaphorin 3A." *Nature* **485**(7396): 69-74.
- He, Z. and M. Tessier-Lavigne (1997). "Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III." *Cell* **90**(4): 739-751.
- Herbst, R. S., J. C. Soria, et al. (2014). "Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients." *Nature* **515**(7528): 563-567.
- Herzog, B., C. Pellet-Many, et al. (2011). "VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation." *Mol Biol Cell* **22**(15): 2766-2776.
- Hjorthaug, H. S. and H. C. Aasheim (2007). "Ephrin-A1 stimulates migration of CD8+CCR7+ T lymphocytes." *Eur J Immunol* **37**(8): 2326-2336.
- Hobo, W., W. J. Norde, et al. (2012). "B and T lymphocyte attenuator mediates inhibition of tumor-reactive CD8+ T cells in patients after allogeneic stem cell transplantation." *J Immunol* **189**(1): 39-49.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." *N Engl J Med* **363**(8): 711-723.
- Hofmann, O., O. L. Caballero, et al. (2008). "Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(51): 20422-20427.
- Holmgaard, R. B., D. A. Schaer, et al. (2018). "Targeting the TGFbeta pathway with galunisertib, a TGFbetaRI small molecule inhibitor, promotes anti-tumor immunity leading to durable, complete responses, as monotherapy and in combination with checkpoint blockade." *J Immunother Cancer* **6**(1): 47.
- Hong, T. M., Y. L. Chen, et al. (2007). "Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer." *Clin Cancer Res* **13**(16): 4759-4768.
- Hu, B., P. Guo, et al. (2007). "Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway." *Oncogene* **26**(38): 5577-5586.
- Huang, B., P. Y. Pan, et al. (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." *Cancer Res* **66**(2): 1123-1131.

- Huang, C. T., C. J. Workman, et al. (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." *Immunity* **21**(4): 503-513.
- Huang, Y. H., C. Zhu, et al. (2015). "CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion." *Nature* **517**(7534): 386-390.
- Huard, B., P. Prigent, et al. (1995). "CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins." *Eur J Immunol* **25**(9): 2718-2721.
- Iannello, A., T. W. Thompson, et al. (2013). "p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells." *J Exp Med* **210**(10): 2057-2069.
- Ikedo, H., L. J. Old, et al. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2): 95-109.
- Ishida, Y., Y. Agata, et al. (1992). "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death." *EMBO J* **11**(11): 3887-3895.
- Ito, D., S. Nojima, et al. (2015). "mTOR Complex Signaling through the SEMA4A-Plexin B2 Axis Is Required for Optimal Activation and Differentiation of CD8+ T Cells." *J Immunol* **195**(3): 934-943.
- Ivashkiv, L. B. and L. T. Donlin (2014). "Regulation of type I interferon responses." *Nat Rev Immunol* **14**(1): 36-49.
- Jackson, S. R., M. Berrien-Elliott, et al. (2014). "Neuropilin-1 expression is induced on tolerant self-reactive CD8+ T cells but is dispensable for the tolerant phenotype." *PLoS One* **9**(10): e110707.
- Jia, H., A. Bagherzadeh, et al. (2006). "Characterization of a bicyclic peptide neuropilin-1 (NP-1) antagonist (EG3287) reveals importance of vascular endothelial growth factor exon 8 for NP-1 binding and role of NP-1 in KDR signaling." *J Biol Chem* **281**(19): 13493-13502.
- Johnston, R. J., L. Comps-Agrar, et al. (2014). "The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function." *Cancer Cell* **26**(6): 923-937.
- Joller, N. and V. K. Kuchroo (2017). "Tim-3, Lag-3, and TIGIT." *Curr Top Microbiol Immunol* **410**: 127-156.
- Jones, K. S., C. Petrow-Sadowski, et al. (2008). "Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells." *Nat Med* **14**(4): 429-436.
- Kaech, S. M. and W. Cui (2012). "Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation." *Nat Rev Immunol* **12**(11): 749-761.
- Kaech, S. M., S. Hemby, et al. (2002). "Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation." *Cell* **111**(6): 837-851.
- Kamphorst, A. O., R. N. Pillai, et al. (2017). "Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**(19): 4993-4998.
- Kao, C., K. J. Oestreich, et al. (2011). "Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection." *Nat Immunol* **12**(7): 663-671.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, et al. (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7556-7561.
- Karpanen, T., C. A. Heckman, et al. (2006). "Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors." *FASEB J* **20**(9): 1462-1472.
- Kaufmann, D. E., D. G. Kavanagh, et al. (2007). "Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction." *Nat Immunol* **8**(11): 1246-1254.
- Kawakami, Y., S. Elyahu, et al. (1994). "Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes." *J Exp Med* **180**(1): 347-352.
- Kawasaki, T., T. Kitsukawa, et al. (1999). "A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel

- formation." *Development* **126**(21): 4895-4902.
- Keefe, D., L. Shi, et al. (2005). "Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis." *Immunity* **23**(3): 249-262.
- Keir, M. E., M. J. Butte, et al. (2008). "PD-1 and its ligands in tolerance and immunity." *Annu Rev Immunol* **26**: 677-704.
- Kikuchi, K., A. Kishino, et al. (2003). "In vitro and in vivo characterization of a novel semaphorin 3A inhibitor, SM-216289 or xanthofulvin." *J Biol Chem* **278**(44): 42985-42991.
- Kim, K., A. D. Skora, et al. (2014). "Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(32): 11774-11779.
- Kioussis, D. and V. Pachnis (2009). "Immune and nervous systems: more than just a superficial similarity?" *Immunity* **31**(5): 705-710.
- Kisielow, M., J. Kisielow, et al. (2005). "Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells." *Eur J Immunol* **35**(7): 2081-2088.
- Kitsukawa, T., M. Shimizu, et al. (1997). "Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice." *Neuron* **19**(5): 995-1005.
- Kitsukawa, T., A. Shimono, et al. (1995). "Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs." *Development* **121**(12): 4309-4318.
- Ko, E. C. and S. C. Formenti (2018). "Radiotherapy and checkpoint inhibitors: a winning new combination?" *Ther Adv Med Oncol* **10**: 1758835918768240.
- Kocak, E., K. Lute, et al. (2006). "Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity." *Cancer Res* **66**(14): 7276-7284.
- Koebel, C. M., W. Vermi, et al. (2007). "Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state." *Nature* **450**(7171): 903-907.
- Kolodkin, A. L., D. V. Levenson, et al. (1997). "Neuropilin is a semaphorin III receptor." *Cell* **90**(4): 753-762.
- Kroon, P., J. Gadiot, et al. (2016). "Concomitant targeting of programmed death-1 (PD-1) and CD137 improves the efficacy of radiotherapy in a mouse model of human BRAFV600-mutant melanoma." *Cancer Immunol Immunother* **65**(6): 753-763.
- Kruger, R. P., J. Aurandt, et al. (2005). "Semaphorins command cells to move." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(10): 789-800.
- Kumanogoh, A. and H. Kikutani (2013). "Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins." *Nat Rev Immunol* **13**(11): 802-814.
- Kusunoki, H., T. Tanaka, et al. (2018). "A novel neuropilin-1-binding sequence in the human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope glycoprotein." *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **1866**(4): 541-548.
- Lai, C., S. August, et al. (2015). "Characteristics of immunosuppressive regulatory T cells in cutaneous squamous cell carcinomas and role in metastasis." *Lancet* **385** *Suppl 1*: S59.
- Lanitis, E., D. Dangaj, et al. (2017). "Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors." *Ann Oncol* **28**(suppl_12): xii18-xii32.
- Larkin, J., V. Chiarion-Sileni, et al. (2015). "Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma." *N Engl J Med* **373**(1): 23-34.
- Lasaro, M. O., M. Sazanovich, et al. (2011). "Active immunotherapy combined with blockade of a coinhibitory pathway achieves regression of large tumor masses in cancer-prone mice." *Mol Ther* **19**(9): 1727-1736.
- Le, D. T., J. N. Uram, et al. (2015). "PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency." *N Engl J Med* **372**(26): 2509-2520.
- Le Floch, A., A. Jalil, et al. (2011). "Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a phospholipase Cgamma-dependent pathway." *Cancer Res* **71**(2): 328-338.

- Le Floch, A., A. Jalil, et al. (2007). "Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis." *J Exp Med* **204**(3): 559-570.
- Le Maux Chansac, B., D. Misse, et al. (2008). "Potentiation of NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma: role of NKG2D-dependent pathway." *Int Immunol* **20**(7): 801-810.
- Lee, J., E. W. Su, et al. (2011). "Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways." *Mol Cell Biol* **31**(19): 3963-3974.
- Lee, Y., S. L. Auh, et al. (2009). "Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment." *Blood* **114**(3): 589-595.
- Lepelletier, Y., I. C. Moura, et al. (2006). "Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization." *Eur J Immunol* **36**(7): 1782-1793.
- Lepelletier, Y., S. Smaniotto, et al. (2007). "Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(13): 5545-5550.
- Li, H., Y. Han, et al. (2009). "Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1." *J Immunol* **182**(1): 240-249.
- Liang, S. C., Y. E. Latchman, et al. (2003). "Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses." *Eur J Immunol* **33**(10): 2706-2716.
- Liang, W. C., M. S. Dennis, et al. (2007). "Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library." *J Mol Biol* **366**(3): 815-829.
- Lin, E. Y., J. F. Li, et al. (2006). "Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer." *Cancer Res* **66**(23): 11238-11246.
- Linden, J. (2011). "Regulation of leukocyte function by adenosine receptors." *Adv Pharmacol* **61**: 95-114.
- Liu, S., H. Zhang, et al. (2013). "Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells." *Cell Death Differ* **20**(3): 456-464.
- Long, H. M., G. Parsonage, et al. (2010). "Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated malignancies." *Drug News Perspect* **23**(4): 221-228.
- Lu, J., Y. Cheng, et al. (2015). "Increased expression of neuropilin 1 in melanoma progression and its prognostic significance in patients with melanoma." *Mol Med Rep* **12**(2): 2668-2676.
- Lu, L., X. Xu, et al. (2014). "Combined PD-1 blockade and GITR triggering induce a potent antitumor immunity in murine cancer models and synergizes with chemotherapeutic drugs." *J Transl Med* **12**: 36.
- Lugade, A. A., J. P. Moran, et al. (2005). "Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor." *J Immunol* **174**(12): 7516-7523.
- Luo, M., L. Hou, et al. (2016). "VEGF/NRP-1axis promotes progression of breast cancer via enhancement of epithelial-mesenchymal transition and activation of NF-kappaB and beta-catenin." *Cancer Lett* **373**(1): 1-11.
- Luo, Y., D. Raible, et al. (1993). "Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones." *Cell* **75**(2): 217-227.
- Macon-Lemaitre, L. and F. Triebel (2005). "The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells." *Immunology* **115**(2): 170-178.
- Mahoney, K. M., P. D. Rennert, et al. (2015). "Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets." *Nat Rev Drug Discov* **14**(8): 561-584.
- Mamluk, R., Z. Gechtman, et al. (2002). "Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain." *J Biol Chem* **277**(27): 24818-24825.
- Man, K., S. S. Gabriel, et al. (2017). "Transcription Factor IRF4 Promotes CD8(+) T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection." *Immunity* **47**(6): 1129-1141 e1125.
- Mandapathil, M., B. Hilldorfer, et al. (2010). "Generation and accumulation of immunosuppressive

- adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells." *J Biol Chem* **285**(10): 7176-7186.
- Marincola, F. M., E. M. Jaffee, et al. (2000). "Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance." *Adv Immunol* **74**: 181-273.
- Mark, M. D., M. Lohrum, et al. (1997). "Patterning neuronal connections by chemorepulsion: the semaphorins." *Cell Tissue Res* **290**(2): 299-306.
- Marone, G., G. Varricchi, et al. (2016). "Mast cells and basophils in inflammatory and tumor angiogenesis and lymphangiogenesis." *Eur J Pharmacol* **778**: 146-151.
- Martinez-Forero, I., A. Azpilikueta, et al. (2013). "T cell costimulation with anti-CD137 monoclonal antibodies is mediated by K63-polyubiquitin-dependent signals from endosomes." *J Immunol* **190**(12): 6694-6706.
- Martinez, G. J., R. M. Pereira, et al. (2015). "The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8⁺ T cells." *Immunity* **42**(2): 265-278.
- Masopust, D. and J. M. Schenkel (2013). "The integration of T cell migration, differentiation and function." *Nat Rev Immunol* **13**(5): 309-320.
- Matloubian, M., R. J. Concepcion, et al. (1994). "CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection." *J Virol* **68**(12): 8056-8063.
- Matson, V., J. Fessler, et al. (2018). "The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients." *Science* **359**(6371): 104-108.
- Matsushita, A., T. Gotze, et al. (2007). "Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1." *Cancer Res* **67**(21): 10309-10316.
- Matsuzaki, J., S. Gnjatic, et al. (2010). "Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(17): 7875-7880.
- McGranahan, N., A. J. Furness, et al. (2016). "Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade." *Science* **351**(6280): 1463-1469.
- McNally, A., G. R. Hill, et al. (2011). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control CD8⁺ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(18): 7529-7534.
- Melero, I., J. V. Johnston, et al. (1998). "NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies." *Cell Immunol* **190**(2): 167-172.
- Melero, I., A. Rouzaut, et al. (2014). "T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy." *Cancer Discov* **4**(5): 522-526.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson, et al. (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." *Nature* **427**(6970): 154-159.
- Mendes-da-Cruz, D. A., Y. Lepelletier, et al. (2009). "Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development." *Ann N Y Acad Sci* **1153**: 20-28.
- Mendes-da-Cruz, D. A., L. Linhares-Lacerda, et al. (2012). "Semaphorins and neuropilins: new players in the neuroendocrine control of the intrathymic T-cell migration in humans." *Exp Physiol* **97**(11): 1146-1150.
- Mendes-da-Cruz, D. A., M. A. Stimamiglio, et al. (2012). "Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins." *FASEB J* **26**(11): 4390-4399.
- Migdal, M., B. Huppertz, et al. (1998). "Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor." *J Biol Chem* **273**(35): 22272-22278.
- Millauer, B., S. Wizigmann-Voos, et al. (1993). "High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis." *Cell* **72**(6): 835-846.
- Milpied, P., B. Massot, et al. (2011). "IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression." *Blood* **118**(11): 2993-3002.
- Milpied, P., A. Renand, et al. (2009). "Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3⁺ Treg." *Eur J Immunol* **39**(6): 1466-1471.
- Mitchell, T. C., O. Hamid, et al. (2018). "Epacadostat Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced

- Solid Tumors: Phase I Results From a Multicenter, Open-Label Phase I/II Trial (ECHO-202/KEYNOTE-037)." *J Clin Oncol*: JCO2018789602.
- Miyauchi, J. T., D. Chen, et al. (2016). "Ablation of Neuropilin 1 from glioma-associated microglia and macrophages slows tumor progression." *Oncotarget* **7**(9): 9801-9814.
- Monney, L., C. A. Sabatos, et al. (2002). "Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease." *Nature* **415**(6871): 536-541.
- Moretti, S., A. Procopio, et al. (2008). "Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts." *Blood* **111**(4): 2290-2299.
- Mrass, P., H. Takano, et al. (2006). "Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells." *J Exp Med* **203**(12): 2749-2761.
- Muhammad, A., H. B. Schiller, et al. (2009). "Sequential cooperation of CD2 and CD48 in the buildup of the early TCR signalosome." *J Immunol* **182**(12): 7672-7680.
- Munn, D. H. (2012). "Blocking IDO activity to enhance anti-tumor immunity." *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 734-745.
- Muratori, C. and L. Tamagnone (2012). "Semaphorin signals tweaking the tumor microenvironment." *Adv Cancer Res* **114**: 59-85.
- Nagaraj, S., K. Gupta, et al. (2007). "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer." *Nat Med* **13**(7): 828-835.
- Naito, Y., K. Saito, et al. (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." *Cancer Res* **58**(16): 3491-3494.
- Nakajima, H., M. Cella, et al. (1999). "Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48." *Eur J Immunol* **29**(5): 1676-1683.
- Nakamura, K., A. Kitani, et al. (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." *J Exp Med* **194**(5): 629-644.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1996). "Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants." *Cancer Metastasis Rev* **15**(2): 153-158.
- Ng, C. T., L. M. Snell, et al. (2013). "Networking at the level of host immunity: immune cell interactions during persistent viral infections." *Cell Host Microbe* **13**(6): 652-664.
- Niles, K. M., J. R. Yeh, et al. (2013). "Haploinsufficiency of the paternal-effect gene Dnmt3L results in transient DNA hypomethylation in progenitor cells of the male germline." *Hum Reprod* **28**(2): 519-530.
- Nissen, J. C. and S. E. Tsirka (2016). "Tuftsin-driven experimental autoimmune encephalomyelitis recovery requires neuropilin-1." *Glia* **64**(6): 923-936.
- Odorizzi, P. M. and E. J. Wherry (2012). "Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections." *J Immunol* **188**(7): 2957-2965.
- Ohaegbulam, K. C., W. Liu, et al. (2017). "Tumor-expressed immune checkpoint B7x promotes cancer progression and antigen-specific CD8 T cell exhaustion and suppressive innate immune cells." *Oncotarget* **8**(47): 82740-82753.
- Oinuma, I., Y. Ishikawa, et al. (2004). "The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras." *Science* **305**(5685): 862-865.
- Okazaki, T., A. Maeda, et al. (2001). "PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13866-13871.
- Okon, I. S., K. A. Coughlan, et al. (2014). "Protein kinase LKB1 promotes RAB7-mediated neuropilin-1 degradation to inhibit angiogenesis." *J Clin Invest* **124**(10): 4590-4602.
- Okoye, I. S., S. M. Coomes, et al. (2014). "MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells." *Immunity* **41**(1): 89-103.
- Ott, P. A., F. S. Hodi, et al. (2013). "CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients." *Clin Cancer Res* **19**(19): 5300-5309.
- Overacre-Delgoffe, A. E., M. Chikina, et al. (2017). "Interferon-gamma Drives Treg Fragility to

- Promote Anti-tumor Immunity." *Cell* **169**(6): 1130-1141 e1111.
- Overwijk, W. W. and N. P. Restifo (2000). "Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the "self" to destroy the "other"." *Crit Rev Immunol* **20**(6): 433-450.
- Paley, M. A., D. C. Kroy, et al. (2012). "Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection." *Science* **338**(6111): 1220-1225.
- Pan, Q., Y. Chantry, et al. (2007). "Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth." *Cancer Cell* **11**(1): 53-67.
- Pan, Y., S. Wang, et al. (2017). "Stat3 contributes to cancer progression by regulating Jab1/Csn5 expression." *Oncogene* **36**(8): 1069-1079.
- Panigrahy, D., I. Adini, et al. (2014). "Regulation of soluble neuropilin 1, an endogenous angiogenesis inhibitor, in liver development and regeneration." *Pathology* **46**(5): 416-423.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 252-264.
- Parry, R. V., J. M. Chemnitz, et al. (2005). "CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms." *Mol Cell Biol* **25**(21): 9543-9553.
- Patel, S. P. and R. Kurzrock (2015). "PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy." *Mol Cancer Ther* **14**(4): 847-856.
- Patnaik, A., P. M. LoRusso, et al. (2014). "A Phase Ib study evaluating MNRP1685A, a fully human anti-NRP1 monoclonal antibody, in combination with bevacizumab and paclitaxel in patients with advanced solid tumors." *Cancer Chemother Pharmacol* **73**(5): 951-960.
- Patsoukis, N., K. Bardhan, et al. (2015). "PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation." *Nat Commun* **6**: 6692.
- Patsoukis, N., J. Brown, et al. (2012). "Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation." *Sci Signal* **5**(230): ra46.
- Patsoukis, N., L. Li, et al. (2013). "PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2." *Mol Cell Biol* **33**(16): 3091-3098.
- Pearce, E. L., A. C. Mullen, et al. (2003). "Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin." *Science* **302**(5647): 1041-1043.
- Peggs, K. S., S. A. Quezada, et al. (2009). "Cancer immunotherapy: co-stimulatory agonists and co-inhibitory antagonists." *Clin Exp Immunol* **157**(1): 9-19.
- Pellet-Many, C., P. Frankel, et al. (2011). "Neuropilin-1 mediates PDGF stimulation of vascular smooth muscle cell migration and signalling via p130Cas." *Biochem J* **435**(3): 609-618.
- Pellet-Many, C., P. Frankel, et al. (2008). "Neuropilins: structure, function and role in disease." *Biochem J* **411**(2): 211-226.
- Penalzoza-MacMaster, P., A. O. Kamphorst, et al. (2014). "Interplay between regulatory T cells and PD-1 in modulating T cell exhaustion and viral control during chronic LCMV infection." *J Exp Med* **211**(9): 1905-1918.
- Peng, D., I. Kryczek, et al. (2015). "Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy." *Nature* **527**(7577): 249-253.
- Pentcheva-Hoang, T., J. G. Egen, et al. (2004). "B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse." *Immunity* **21**(3): 401-413.
- Perkins, D., Z. Wang, et al. (1996). "Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation." *J Immunol* **156**(11): 4154-4159.
- Phan, G. Q., J. C. Yang, et al. (2003). "Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8372-8377.
- Philip, M., L. Fairchild, et al. (2017). "Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming." *Nature* **545**(7655): 452-456.
- Piechnik, A., A. Dmoszynska, et al. (2013). "The VEGF receptor, neuropilin-1, represents a promising novel target for chronic lymphocytic leukemia patients." *Int J Cancer* **133**(6): 1489-1496.
- Podojil, J. R., M. Y. Chiang, et al. (2018). "B7-H4 Modulates Regulatory CD4(+) T Cell Induction and Function via Ligation of a Semaphorin 3a/Plexin A4/Neuropilin-1 Complex." *J Immunol* **201**(3):

897-907.

- Polleux, F., T. Morrow, et al. (2000). "Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites." *Nature* **404**(6778): 567-573.
- Poltorak, Z., T. Cohen, et al. (1997). "VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix." *J Biol Chem* **272**(11): 7151-7158.
- Popovic, A., E. M. Jaffee, et al. (2018). "Emerging strategies for combination checkpoint modulators in cancer immunotherapy." *J Clin Invest* **128**(8): 3209-3218.
- Prud'homme, G. J. and Y. Glinka (2012). "Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity." *Oncotarget* **3**(9): 921-939.
- Quandt, D., H. Hoff, et al. (2007). "A new role of CTLA-4 on B cells in thymus-dependent immune responses in vivo." *J Immunol* **179**(11): 7316-7324.
- Quigley, D., L. Silwal-Pandit, et al. (2015). "Lymphocyte Invasion in IC10/Basal-Like Breast Tumors Is Associated with Wild-Type TP53." *Mol Cancer Res* **13**(3): 493-501.
- Quigley, M., F. Pereyra, et al. (2010). "Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF." *Nat Med* **16**(10): 1147-1151.
- Qureshi, O. S., Y. Zheng, et al. (2011). "Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4." *Science* **332**(6029): 600-603.
- Raimondi, C., A. Fantin, et al. (2014). "Imatinib inhibits VEGF-independent angiogenesis by targeting neuropilin 1-dependent ABL1 activation in endothelial cells." *J Exp Med* **211**(6): 1167-1183.
- Redmond, W. L., C. E. Ruby, et al. (2009). "The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival." *Crit Rev Immunol* **29**(3): 187-201.
- Reizis, B., A. Bunin, et al. (2011). "Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions." *Annu Rev Immunol* **29**: 163-183.
- Renand, A., P. Milpied, et al. (2013). "Neuropilin-1 expression characterizes T follicular helper (Tfh) cells activated during B cell differentiation in human secondary lymphoid organs." *PLoS One* **8**(12): e85589.
- Restifo, N. P., M. E. Dudley, et al. (2012). "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response." *Nat Rev Immunol* **12**(4): 269-281.
- Rivera, L. B. and G. Bergers (2013). "Location, location, location: macrophage positioning within tumors determines pro- or antitumor activity." *Cancer Cell* **24**(6): 687-689.
- Rizvi, N. A., M. D. Hellmann, et al. (2016). "Nivolumab in Combination With Platinum-Based Doublet Chemotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *J Clin Oncol* **34**(25): 2969-2979.
- Rizvi, N. A., M. D. Hellmann, et al. (2015). "Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer." *Science* **348**(6230): 124-128.
- Rizzolio, S., N. Rabinowicz, et al. (2012). "Neuropilin-1-dependent regulation of EGF-receptor signaling." *Cancer Res* **72**(22): 5801-5811.
- Rizzolio, S. and L. Tamagnone (2011). "Multifaceted role of neuropilins in cancer." *Curr Med Chem* **18**(23): 3563-3575.
- Robbins, P. F., R. A. Morgan, et al. (2011). "Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1." *J Clin Oncol* **29**(7): 917-924.
- Robert, C., D. Schadendorf, et al. (2013). "Efficacy and safety of retreatment with ipilimumab in patients with pretreated advanced melanoma who progressed after initially achieving disease control." *Clin Cancer Res* **19**(8): 2232-2239.
- Rogers, P. R., J. Song, et al. (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." *Immunity* **15**(3): 445-455.
- Romero, P., A. Zippelius, et al. (2007). "Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes." *J Immunol* **178**(7): 4112-4119.
- Ronchetti, S., O. Zollo, et al. (2004). "GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations." *Eur J Immunol* **34**(3): 613-622.
- Ropponen, K. M., M. J. Eskelinen, et al. (1997). "Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes

- (TILs) in colorectal cancer." *J Pathol* **182**(3): 318-324.
- Roskoski, R., Jr. (2007). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression." *Crit Rev Oncol Hematol* **62**(3): 179-213.
- Routy, B., E. Le Chatelier, et al. (2018). "Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors." *Science* **359**(6371): 91-97.
- Roy, S., A. K. Bag, et al. (2017). "Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System: Potential Targets for Immunotherapy." *Front Immunol* **8**: 1228.
- Rudd, C. E. and H. Schneider (2003). "Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling." *Nat Rev Immunol* **3**(7): 544-556.
- Rudd, C. E., A. Taylor, et al. (2009). "CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction." *Immunol Rev* **229**(1): 12-26.
- Ruffini, F., G. Graziani, et al. (2015). "Cilengitide downmodulates invasiveness and vasculogenic mimicry of neuropilin 1 expressing melanoma cells through the inhibition of alphavbeta5 integrin." *Int J Cancer* **136**(6): E545-558.
- Rygaard, J. and C. O. Povlsen (1974). "Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function?" *Transplantation* **17**(1): 135-136.
- Rygaard, J. and C. O. Povlsen (1974). "The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance." *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* **82**(1): 99-106.
- Sabbagh, L., G. Pulle, et al. (2008). "ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo." *J Immunol* **180**(12): 8093-8101.
- Said, E. A., F. P. Dupuy, et al. (2010). "Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection." *Nat Med* **16**(4): 452-459.
- Sakuishi, K., L. Apetoh, et al. (2010). "Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity." *J Exp Med* **207**(10): 2187-2194.
- Sanmamed, M. F. and L. Chen (2018). "A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization." *Cell* **175**(2): 313-326.
- Saoulli, K., S. Y. Lee, et al. (1998). "CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand." *J Exp Med* **187**(11): 1849-1862.
- Sarkar, S., V. Kalia, et al. (2008). "Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates." *J Exp Med* **205**(3): 625-640.
- Sarris, M., K. G. Andersen, et al. (2008). "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition." *Immunity* **28**(3): 402-413.
- Schachter, J., A. Ribas, et al. (2017). "Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006)." *Lancet* **390**(10105): 1853-1862.
- Schietinger, A. and P. D. Greenberg (2014). "Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction." *Trends Immunol* **35**(2): 51-60.
- Schietinger, A., M. Philip, et al. (2016). "Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis." *Immunity* **45**(2): 389-401.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et al. (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* **331**(6024): 1565-1570.
- Schuch, G., M. Machluf, et al. (2002). "In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo." *Blood* **100**(13): 4622-4628.
- Sedy, J. R., M. Gavrieli, et al. (2005). "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." *Nat Immunol* **6**(1): 90-98.
- Sehrawat, S., P. B. Reddy, et al. (2010). "Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response." *PLoS Pathog* **6**(5): e1000882.
- Senger, D. R., S. J. Galli, et al. (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that

- promotes accumulation of ascites fluid." *Science* **219**(4587): 983-985.
- Serafini, P., I. Borrello, et al. (2006). "Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression." *Semin Cancer Biol* **16**(1): 53-65.
- Shaked, H., L. J. Hofseth, et al. (2012). "Chronic epithelial NF-kappaB activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(35): 14007-14012.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* **410**(6832): 1107-1111.
- Sharpe, A. H. (2009). "Mechanisms of costimulation." *Immunol Rev* **229**(1): 5-11.
- Sharpe, A. H., E. J. Wherry, et al. (2007). "The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection." *Nat Immunol* **8**(3): 239-245.
- Sheppard, K. A., L. J. Fitz, et al. (2004). "PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta." *FEBS Lett* **574**(1-3): 37-41.
- Sherman, M. Y. and V. L. Gabai (2015). "Hsp70 in cancer: back to the future." *Oncogene* **34**(32): 4153-4161.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." *Nat Immunol* **3**(2): 135-142.
- Shin, H., S. D. Blackburn, et al. (2009). "A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection." *Immunity* **31**(2): 309-320.
- Shin, H. and E. J. Wherry (2007). "CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection." *Curr Opin Immunol* **19**(4): 408-415.
- Sica, A., P. Larghi, et al. (2008). "Macrophage polarization in tumour progression." *Semin Cancer Biol* **18**(5): 349-355.
- Simpson, T. R., F. Li, et al. (2013). "Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma." *J Exp Med* **210**(9): 1695-1710.
- Sinha, P., V. K. Clements, et al. (2005). "Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis." *Cancer Res* **65**(24): 11743-11751.
- Snell, L. M., G. H. Lin, et al. (2011). "T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy." *Immunol Rev* **244**(1): 197-217.
- Soker, S., S. Takashima, et al. (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." *Cell* **92**(6): 735-745.
- Solomon, B. D., C. Mueller, et al. (2011). "Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 2040-2045.
- Song, H., G. Ming, et al. (1998). "Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides." *Science* **281**(5382): 1515-1518.
- Song, J., T. So, et al. (2005). "Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion." *Immunity* **22**(5): 621-631.
- Sorkin, A. (2001). "Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 4): 480-484.
- Sorkin, A. and L. K. Goh (2008). "Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs." *Exp Cell Res* **314**(17): 3093-3106.
- Spranger, S. (2016). "Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment." *Int Immunol* **28**(8): 383-391.
- Spranger, S., H. K. Koblish, et al. (2014). "Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment." *J Immunother Cancer* **2**: 3.
- Spranger, S., R. M. Spaapen, et al. (2013). "Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells." *Sci Transl Med* **5**(200): 200ra116.
- Srivastava, M. K., P. Sinha, et al. (2010). "Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine." *Cancer Res* **70**(1): 68-77.

- Stanietsky, N., H. Simic, et al. (2009). "The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(42): 17858-17863.
- Staron, M. M., S. M. Gray, et al. (2014). "The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection." *Immunity* **41**(5): 802-814.
- Staton, C. A., I. Kumar, et al. (2007). "Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis." *J Pathol* **212**(3): 237-248.
- Stephen, T. L., M. R. Rutkowski, et al. (2014). "Transforming growth factor beta-mediated suppression of antitumor T cells requires FoxP1 transcription factor expression." *Immunity* **41**(3): 427-439.
- Streeck, H., Z. L. Brumme, et al. (2008). "Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells." *PLoS Med* **5**(5): e100.
- Street, S. E., E. Cretney, et al. (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." *Blood* **97**(1): 192-197.
- Street, S. E., J. A. Trapani, et al. (2002). "Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma." *J Exp Med* **196**(1): 129-134.
- Sucker, A., F. Zhao, et al. (2014). "Genetic evolution of T-cell resistance in the course of melanoma progression." *Clin Cancer Res* **20**(24): 6593-6604.
- Sulpice, E., J. Plouet, et al. (2008). "Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity." *Blood* **111**(4): 2036-2045.
- Sun, R., E. J. Limkin, et al. (2018). "A radiomics approach to assess tumour-infiltrating CD8 cells and response to anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy: an imaging biomarker, retrospective multicohort study." *Lancet Oncol* **19**(9): 1180-1191.
- Suzuki, K., A. Kumanogoh, et al. (2008). "Semaphorins and their receptors in immune cell interactions." *Nat Immunol* **9**(1): 17-23.
- Tahara-Hanaoka, S., K. Shibuya, et al. (2006). "Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor." *Blood* **107**(4): 1491-1496.
- Takagi, S., T. Hirata, et al. (1991). "The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors." *Neuron* **7**(2): 295-307.
- Takagi, S., Y. Kasuya, et al. (1995). "Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system." *Dev Biol* **170**(1): 207-222.
- Takagi, S., T. Tsuji, et al. (1987). "Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies." *Dev Biol* **122**(1): 90-100.
- Takahashi, T., A. Fournier, et al. (1999). "Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors." *Cell* **99**(1): 59-69.
- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." *J Exp Med* **192**(2): 303-310.
- Takamatsu, H., N. Takegahara, et al. (2010). "Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II." *Nat Immunol* **11**(7): 594-600.
- Takashima, S., M. Kitakaze, et al. (2002). "Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3657-3662.
- Tamagnone, L., S. Artigiani, et al. (1999). "Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates." *Cell* **99**(1): 71-80.
- Taqueti, V. R., N. Grabie, et al. (2006). "T-bet controls pathogenicity of CTLs in the heart by separable effects on migration and effector activity." *J Immunol* **177**(9): 5890-5901.
- Tau, G. Z., S. N. Cowan, et al. (2001). "Regulation of IFN-gamma signaling is essential for the cytotoxic activity of CD8(+) T cells." *J Immunol* **167**(10): 5574-5582.
- Taube, J. M., R. A. Anders, et al. (2012). "Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape." *Sci Transl Med* **4**(127): 127ra137.

- Teijaro, J. R., C. Ng, et al. (2013). "Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling." *Science* **340**(6129): 207-211.
- Teixido, C., M. Gonzalez-Cao, et al. (2015). "Predictive factors for immunotherapy in melanoma." *Ann Transl Med* **3**(15): 208.
- Theoret, M. R., C. J. Cohen, et al. (2008). "Relationship of p53 overexpression on cancers and recognition by anti-p53 T cell receptor-transduced T cells." *Hum Gene Ther* **19**(11): 1219-1232.
- Thommen, D. S., V. H. Koelzer, 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**(7): 994-1004.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* **188**(2): 287-296.
- Tinoco, R., V. Alcalde, et al. (2009). "Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo." *Immunity* **31**(1): 145-157.
- Topalian, S. L., C. G. Drake, et al. (2015). "Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy." *Cancer Cell* **27**(4): 450-461.
- Topalian, S. L., F. S. Hodi, et al. (2012). "Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer." *N Engl J Med* **366**(26): 2443-2454.
- Topalian, S. L., M. Sznol, et al. (2014). "Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab." *J Clin Oncol* **32**(10): 1020-1030.
- Tordjman, R., Y. Lepelletier, et al. (2002). "A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response." *Nat Immunol* **3**(5): 477-482.
- Trautmann, L., L. Janbazian, et al. (2006). "Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction." *Nat Med* **12**(10): 1198-1202.
- Triebel, F., S. Jitsukawa, et al. (1990). "LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4." *J Exp Med* **171**(5): 1393-1405.
- Tschopp, J., D. Masson, et al. (1986). "Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytolysis." *Nature* **322**(6082): 831-834.
- Tumeh, P. C., C. L. Harview, et al. (2014). "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance." *Nature* **515**(7528): 568-571.
- Valdembri, D., P. T. Caswell, et al. (2009). "Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells." *PLoS Biol* **7**(1): e25.
- Valk, E., C. E. Rudd, et al. (2008). "CTLA-4 trafficking and surface expression." *Trends Immunol* **29**(6): 272-279.
- Van Allen, E. M., D. Miao, et al. (2015). "Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma." *Science* **350**(6257): 207-211.
- van Berkel, M. E. and M. A. Oosterwegel (2006). "CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells?" *Immunol Lett* **105**(2): 115-122.
- van der Burg, S. H. and C. J. Melief (2011). "Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies." *Curr Opin Immunol* **23**(2): 252-257.
- Veiga-Parga, T., S. Sehrawat, et al. (2013). "Role of regulatory T cells during virus infection." *Immunol Rev* **255**(1): 182-196.
- Vezys, V., P. Penaloza-MacMaster, et al. (2011). "4-1BB signaling synergizes with programmed death ligand 1 blockade to augment CD8 T cell responses during chronic viral infection." *J Immunol* **187**(4): 1634-1642.
- Vibhakar, R., G. Juan, et al. (1997). "Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes." *Exp Cell Res* **232**(1): 25-28.
- Vignali, D. A., L. W. Collison, et al. (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* **8**(7): 523-532.
- Vigneron, N., V. Stroobant, et al. (2013). "Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update." *Cancer Immun* **13**: 15.

- Voron, T., O. Colussi, et al. (2015). "VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors." *J Exp Med* **212**(2): 139-148.
- Waggoner, S. N., M. Cornberg, et al. (2011). "Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells." *Nature* **481**(7381): 394-398.
- Wallerius, M., T. Wallmann, et al. (2016). "Guidance Molecule SEMA3A Restricts Tumor Growth by Differentially Regulating the Proliferation of Tumor-Associated Macrophages." *Cancer Res* **76**(11): 3166-3178.
- Wang, C., A. J. McPherson, et al. (2012). "Loss of the signaling adaptor TRAF1 causes CD8+ T cell dysregulation during human and murine chronic infection." *J Exp Med* **209**(1): 77-91.
- Wang, S., X. Gao, et al. (2016). "Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity." *Sci Rep* **6**: 24249.
- Wang, T., G. Niu, et al. (2004). "Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells." *Nat Med* **10**(1): 48-54.
- Watanabe, N., M. Gavrieli, et al. (2003). "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." *Nat Immunol* **4**(7): 670-679.
- Weekes, C. D., M. Beeram, et al. (2014). "A phase I study of the human monoclonal anti-NRP1 antibody MNRP1685A in patients with advanced solid tumors." *Invest New Drugs* **32**(4): 653-660.
- Wei, F., S. Zhong, et al. (2013). "Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(27): E2480-2489.
- Wei, S. C., J. H. Levine, et al. (2017). "Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade." *Cell* **170**(6): 1120-1133 e1117.
- Weiss, J. M., A. M. Bilate, et al. (2012). "Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells." *J Exp Med* **209**(10): 1723-1742, S1721.
- Welch, M. J., J. R. Teijaro, et al. (2012). "CD8 T cell defect of TNF-alpha and IL-2 in DNAM-1 deficient mice delays clearance in vivo of a persistent virus infection." *Virology* **429**(2): 163-170.
- Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." *Nat Immunol* **12**(6): 492-499.
- Wherry, E. J., J. N. Blattman, et al. (2003). "Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment." *J Virol* **77**(8): 4911-4927.
- Wherry, E. J., S. J. Ha, et al. (2007). "Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection." *Immunity* **27**(4): 670-684.
- Wherry, E. J. and M. Kurachi (2015). "Molecular and cellular insights into T cell exhaustion." *Nat Rev Immunol* **15**(8): 486-499.
- Whitaker, G. B., B. J. Limberg, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121)." *J Biol Chem* **276**(27): 25520-25531.
- Williams, J. B., B. L. Horton, et al. (2017). "The EGR2 targets LAG-3 and 4-1BB describe and regulate dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells in the tumor microenvironment." *J Exp Med* **214**(2): 381-400.
- Williams, L. D., A. Bansal, et al. (2011). "Interleukin-21-producing HIV-1-specific CD8 T cells are preferentially seen in elite controllers." *J Virol* **85**(5): 2316-2324.
- Wilson, A. M., Z. Shao, et al. (2018). "Neuropilin-1 expression in adipose tissue macrophages protects against obesity and metabolic syndrome." *Sci Immunol* **3**(21).
- Wilson, E. B., D. H. Yamada, et al. (2013). "Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection." *Science* **340**(6129): 202-207.
- Wing, K., Y. Onishi, et al. (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." *Science* **322**(5899): 271-275.
- Wohlleber, D., H. Kashkar, et al. (2012). "TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation." *Cell Rep* **2**(3): 478-487.
- Wolchok, J. D., H. Kluger, et al. (2013). "Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma." *N Engl J*

- Med **369**(2): 122-133.
- Wolfel, T., A. Van Pel, et al. (1994). "Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes." Eur J Immunol **24**(3): 759-764.
- Woo, S. R., M. B. Fuertes, et al. (2014). "STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors." Immunity **41**(5): 830-842.
- Woolard, J., W. Y. Wang, et al. (2004). "VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression." Cancer Res **64**(21): 7822-7835.
- Workman, C. J., L. S. Cauley, et al. (2004). "Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo." J Immunol **172**(9): 5450-5455.
- Workman, C. J., K. J. Dugger, et al. (2002). "Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3." J Immunol **169**(10): 5392-5395.
- Workman, C. J., Y. Wang, et al. (2009). "LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis." J Immunol **182**(4): 1885-1891.
- Worzfeld, T. and S. Offermanns (2014). "Semaphorins and plexins as therapeutic targets." Nat Rev Drug Discov **13**(8): 603-621.
- Wyckoff, J. B., Y. Wang, et al. (2007). "Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors." Cancer Res **67**(6): 2649-2656.
- Xu, F., J. Liu, et al. (2014). "LSECTin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses." Cancer Res **74**(13): 3418-3428.
- Xue, W., L. Zender, et al. (2007). "Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas." Nature **445**(7128): 656-660.
- Yadav, M., C. Louvet, et al. (2012). "Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo." J Exp Med **209**(10): 1713-1722, S1711-1719.
- Yanagisawa, K., M. A. Exley, et al. (2006). "Hyporesponsiveness to natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide in cancer-bearing state mediated by CD11b+ Gr-1+ cells producing nitric oxide." Cancer Res **66**(23): 11441-11446.
- Yaron, A., P. H. Huang, et al. (2005). "Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins." Neuron **45**(4): 513-523.
- Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochim Biophys Acta **1783**(5): 673-694.
- Yi, J. S., M. Du, et al. (2009). "A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection." Science **324**(5934): 1572-1576.
- Yi, M., D. Jiao, et al. (2018). "Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors." Mol Cancer **17**(1): 129.
- Yokosuka, T., M. Takamatsu, et al. (2012). "Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2." J Exp Med **209**(6): 1201-1217.
- Yu, X., K. Harden, et al. (2009). "The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells." Nat Immunol **10**(1): 48-57.
- Yuan, G. and G. B. Jones (2014). "Towards next generation adenosine A(2A) receptor antagonists." Curr Med Chem **21**(34): 3918-3935.
- Zachary, I. and G. Gliki (2001). "Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family." Cardiovasc Res **49**(3): 568-581.
- Zajac, A. J., J. N. Blattman, et al. (1998). "Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function." J Exp Med **188**(12): 2205-2213.
- Zhang, S., H. E. Zhou, et al. (2010). "Vascular endothelial growth factor regulates myeloid cell leukemia-1 expression through neuropilin-1-dependent activation of c-MET signaling in human prostate cancer cells." Mol Cancer **9**: 9.
- Zhou, Y., N. Shao, et al. (2017). "Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in

- patients with breast cancer: a meta-analysis." J Cancer **8**(19): 4098-4105.
- Zhu, C., A. C. Anderson, et al. (2005). "The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity." Nat Immunol **6**(12): 1245-1252.
- Zhu, H., H. Cai, et al. (2014). "Neuropilin-1 is overexpressed in osteosarcoma and contributes to tumor progression and poor prognosis." Clin Transl Oncol **16**(8): 732-738.
- Zhu, J., C. G. Powis de Tenbossche, et al. (2017). "Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes." Nat Commun **8**(1): 1404.

ANNEXE

Publication collaborative :

“TGF- β signaling intersects with CD103 integrin signaling to promote T-lymphocyte accumulation and antitumor activity in the lung tumor microenvironment”

Boutet M, Gauthier L, Leclerc M, Gros G, de Montpreville V, Théret N, Donnadiou E, Mami-Chouaib F.

Cancer Research, 2016.

TGF β Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment

Marie Boutet^{1,2}, Ludiane Gauthier^{1,2}, Marine Leclerc^{1,2}, Gwendoline Gros^{1,2}, Vincent de Montpreville^{1,3}, Nathalie Théret⁴, Emmanuel Donnadieu^{5,6,7}, and Fathia Mami-Chouaib^{1,2}

Abstract

Homing of CD8⁺ T lymphocytes to the tumor microenvironment is an important step for mounting a robust antitumor immune response. TGF β is responsible for CD103 ($\alpha_1\beta_7$) integrin induction in activated intraepithelial CD8⁺ T lymphocytes. However, the interplay between TGF β and CD103 and their contribution to T-cell infiltration and antitumor activity remain unknown. Here, we used viable human lung tumor slices and autologous tumor antigen-specific T-lymphocyte clones to provide evidence that CD103 is directly involved in T-lymphocyte recruitment within epithelial tumor islets and intratumoral early T-cell signaling. Moreover, TGF β enhanced CD103-dependent T-cell adhesion and signaling, whereas it inhibited leukocyte func-

tion-associated antigen (LFA)-1 ($\alpha_1\beta_2$) integrin expression and LFA-1-mediated T-lymphocyte functions. Mechanistic investigations revealed that TGF β bound to its receptors (TGFBR), which promoted the recruitment and phosphorylation of integrin-linked kinase (ILK) by TGFBR1. We further show that ILK interacted with the CD103 intracellular domain, resulting in protein kinase B (PKB)/AKT activation, thereby initiating integrin inside-out signaling. Collectively, our findings suggest that the abundance of TGF β in the tumor microenvironment may in fact engage with integrin signaling pathways to promote T-lymphocyte antitumor functions, with potential implications for T-cell-based immunotherapies for cancer. *Cancer Res*; 76(7): 1757–69. ©2016 AACR.

Introduction

Adequate positioning of tumor antigen-specific T cells into tumor tissues plays a central role in an effective antitumor immune response. Hence, the number of CD8⁺ T cells found in contact with tumor cells is usually associated with good outcome in cancer patients (1). Recruitment of T lymphocytes within the tumor involves multiple sequential steps regulated by molecular interactions with several stromal cell types and coordinated by chemotactic agents, cell surface adhesion molecules, and extracellular matrix (ECM) proteins. Integrins are one of the major families of adhesion molecules that mediate cell-ECM and cell-

cell interactions (2). Adhesion of T cells to ECM proteins or cellular integrin ligands is fundamental for lymphocyte development, migration, extravasation, and activation (3, 4). Among the integrin family members, LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$, CD11a/CD18) is essential for lymphocyte homing in lymphoid and nonlymphoid tissues, transmigration, and antigen-specific T-cell responses (3). On naive T lymphocytes, LFA-1 has weak affinity for its ligands, the intercellular adhesion molecules (ICAM). However, T-cell stimulation through T-cell receptor (TCR) or chemokine receptors triggers an "inside-out" signal that results in LFA-1 activation by inducing integrin-extended conformation and clustering, thereby increasing its affinity for its ligands (5). Firm adhesion of LFA-1 to ICAM-1 (CD54) initiates an "outside-in" signal that has costimulatory functions in TCR signaling, thus contributing to T-cell stimulation, spreading, and cytotoxicity (6, 7).

The α_6 (CD103) β_7 integrin, hereafter referred to as CD103, plays a crucial role in TCR-mediated cytokine secretion and cytotoxic activity toward epithelial tumors by interacting with its ligand, epithelial cell marker E-cadherin, on target cells (8, 9). This integrin is essential in controlling CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) activities, not only by promoting effector T-cell adhesion to tumor cells, but also by triggering intracellular signaling events that costimulate TCR signals (10). A role for CD103 in T-cell homing into epithelia has been suggested (11, 12); however, accumulating evidence indicates a role for CD103 in retention of T-lymphocyte subpopulations in epithelial tissues (13). Consistently, CD103 mediates arrest of T lymphocytes by interacting with E-cadherin on epithelial tumors (9) and recruiting CCR5 at the immune synapse (IS) with cancer cells (14). Moreover, an enhanced CD103⁺ TIL subset correlates with

¹INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) UMR1186, Laboratory Integrative Tumor Immunology and Genetic Oncology, France. ²INSERM, Gustave Roussy, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Villejuif, France. ³Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, Service d'Anatomie Pathologique, LePlessis-Robinson, France. ⁴INSERM UMR1085, IRSET, Université de Rennes 1, Rennes, France. ⁵INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France. ⁶CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) UMR8104, Paris, France. ⁷Université Paris Descartes, Paris, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

M. Leclerc and G. Gros contributed equally to this article.

Corresponding Author: Fathia Mami-Chouaib, Gustave Roussy, 114, Rue Edouard Vaillant, Villejuif 94805, France. Phone: 0033142114965; Fax: 0033142115288; E-mail: fathia.mami-chouaib@gustaveroussy.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1545

©2016 American Association for Cancer Research.

www.aacrjournals.org

AAGR 1757

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on October 13, 2018. © 2016 American Association for Cancer Research.

Boutet et al.

improved patient survival in ovarian (15) and lung (16) carcinomas and increased intraepithelial lymphocyte infiltration, suggesting that CD103 promotes recruitment of TIL within epithelial tumor islets. However, the true contribution of CD103 to promoting T-cell infiltration into tumor regions, and the influence of TGF β , abundant within the tumor microenvironment and responsible for *ITGAE* gene expression in TCR-engaged CD8⁺ T lymphocytes (8, 17, 18), on integrin functions remain poorly understood. Using viable human tumor slices (19) and autologous tumor antigen-specific CTL clones, we show here that CD103 promotes T-cell recruitment within epithelial tumor regions and enhances intratumoral T-cell early signaling. We also show that TGF β upregulates CD103-dependent T-cell effector functions by triggering TGFBR1 (activin receptor-like kinase-5, ALK5)-mediated phosphorylation of ILK and its subsequent binding to CD103, thus initiating inside-out signaling leading to activation of the integrin and strengthening of CD103-E-cadherin adhesion.

Materials and Methods

Tumor cell lines, T-cell clones, and freshly isolated TIL

IGR-Heu and IGR-Heu-ICAM-1 tumor cell lines were derived in one of our laboratories in 1996 as previously described (8). Heu171 (CD103⁺/LFA-1⁺) and H32-22 (CD103⁻/LFA-1⁺) T-cell clones were generated from autologous TIL and peripheral blood lymphocytes (PBL), respectively. Cells were regularly tested and authenticated by immunofluorescence analysis and cytotoxic assay including in this work. Fresh CD8⁺ TIL were isolated using a FACS ARIA cell sorter.

Recombinant molecules, antibodies, and chemical inhibitors

Recombinant (r) E-cadherin-Fc (rE-cadh-Fc), rICAM-1-Fc and rFibronectin-Fc molecules were provided by R&D Systems. rCXCL12 and rTGF β was purchased from PeproTech and Abcys, respectively. Anti-CD103 and anti- β_2 mAb were purchased from Beckman Coulter, and PE-conjugated anti-CD103 from eBiosciences. Anti-CD3 (UCHL1) was provided by Ozyme and anti-CD8 by BioLegend. Anti-ILK and anti-phosphorylated (phospho)-ILK (Ser-246) mAb were purchased from Millipore. Anti-TGFBR1 and secondary mAb were provided by Santa Cruz Biotechnology. Anti-AKT/PKB and anti-phospho-AKT were purchased from Cell-Signaling. Anti-KLRG1 was a gift from H Pircher. TGRBR1 kinase inhibitor SB-431542 (SB) and PI3K inhibitor Wortmannin were supplied by Sigma-Aldrich. Phospho-AKT inhibitor MK-2206 was purchased from Millipore and ILK inhibitor QLT-0267 (QLT) from Quadra Logic Technology.

Confocal microscopy analyses

For T-cell adhesion, poly-L-lysine slices were coated with rE-cadh-Fc, rICAM-1-Fc, or rFibronectin-Fc (5 μ g/mL) overnight at 4°C. T cells, nonstimulated or stimulated with rCXCL12 (100 nmol/L) or rTGF β (2 ng/mL), were incubated on precoated slices as described (8, 9). Cells shape index was calculated as the ratio of the longer to the shorter axis measured via Image J software. For protein polarization, lymphocytes, untreated or pretreated with SB (1 μ mol/L), QLT (20 μ mol/L), or with rTGF β were preincubated with IGR-Heu cells, or rE-cadh-Fc-coupled protein G-Dynabeads, at a 2:1 effector to target cell (E:T) ratio and then plated on poly-(L-lysine)-coated coverslips. Cells were stained with mouse anti-CD103, rabbit anti-phospho-ILK, or goat anti-TGFBR1 mAb, followed by anti-mouse-Alexa Fluor-546, anti-rabbit-Alexa Fluor-647 or anti-goat-Alexa Fluor-488

Ab, respectively. Coverslips were analyzed using a fluorescence microscope with $\times 20$ (adhesion) or $\times 63$ (spreading and protein relocalization) lenses as described (9).

Tumor slices and T-cell recruitment experiments

Xenograft tumor samples were embedded in low-gelling-temperature agarose as reported (19). Lymphocytes were stained with SNARF and added onto the cut surface of each slice. In some experiments, T cells were preincubated with neutralizing anti-CD103 (anti- α_E , 10 μ g/mL), anti- β_2 (10 μ g/mL), or anti-CD3 (1 μ g/mL), or treated with rTGF β . Slices were then stained with anti-E-cadherin mAb followed by a secondary Ab (Alexa Fluor-488). Images were acquired with a $\times 4$ or $\times 10$ (S fluor; Nikon) objective and MetaVue imaging software (Universal Imaging).

Single-cell calcium measurement

The calcium response was measured in the same tumor slice with T cells loaded with 1 μ mol/L Fura-2AM (Molecular Probes). One of the two clones was also labeled with 5-chloromethyl-fluorescein diacetate (CMFDA; 5 nmol/L). Fura-2AM-loaded lymphocytes and infiltrated into tumor slices were alternatively excited every 10 s at 350 and 380 nm on an inverted Eclipse TE300 microscope equipped with a $\times 20$ objective and a Metafluor imaging system. Emissions at 510 nm were used for the analysis of Ca²⁺ responses. Values were represented as a ratio: fluorescence intensity at 350 nm/fluorescence intensity at 380 nm.

Western blot and immunoprecipitation experiments

Lymphocytes, untreated or pretreated with rTGF β , were unstimulated or stimulated with plastic-coated rE-cadh-Fc. Equivalent amounts of protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane as described (10). Blots were then probed with rabbit anti-phospho(Ser-246)-ILK, anti-phospho(Ser-473)-AKT/PKB, anti-AKT/PKB or anti- β -actin-peroxidase followed by secondary HRP-conjugated Ab.

For immunoprecipitation, T-cell extracts were incubated for 2 h at 4°C with cross-linked anti-TGFBR1 or anti-CD103 beads, or protein G-Sepharose beads prebound with control goat or mouse IgG. Beads were then washed and eluted with reducing agent at 95°C.

Flow cytometric analysis and cytotoxicity assay

For granule exocytosis, T cells, untreated or pretreated with inhibitors or cultured with rTGF β , were stimulated with a combination of rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc (2.5 μ g/mL) and UCIF1 mAb (0.4 μ g/mL) in the presence of anti-CD103 mAb and monensin A (10). A high concentration of anti-CD3 (10 μ g/mL) was used as a control. Cytotoxicity was evaluated with a conventional ⁵¹Cr-release assay (8).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the two-tailed Student *t*-test. Two groups were considered as significantly different if *P* < 0.05.

Results

Regulation of CD103-dependent T-cell adhesion and motility by TGF β

Thus far, little is known about the involvement of CD103 in T-cell migration and regulation of integrin activities by TGF β .

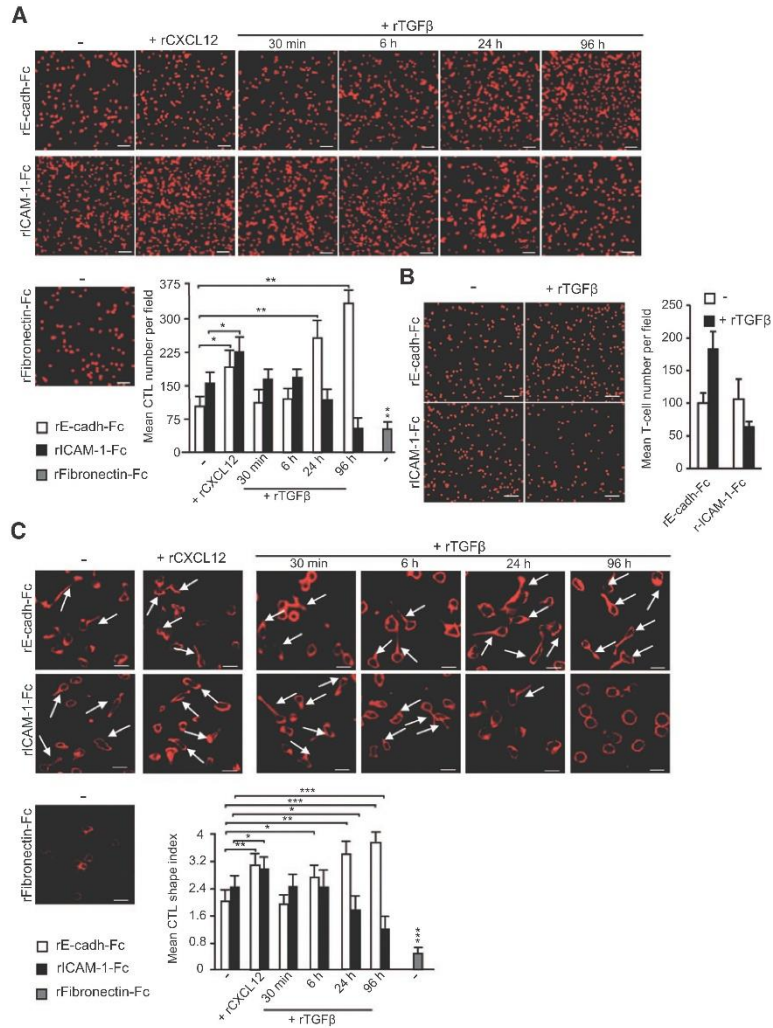
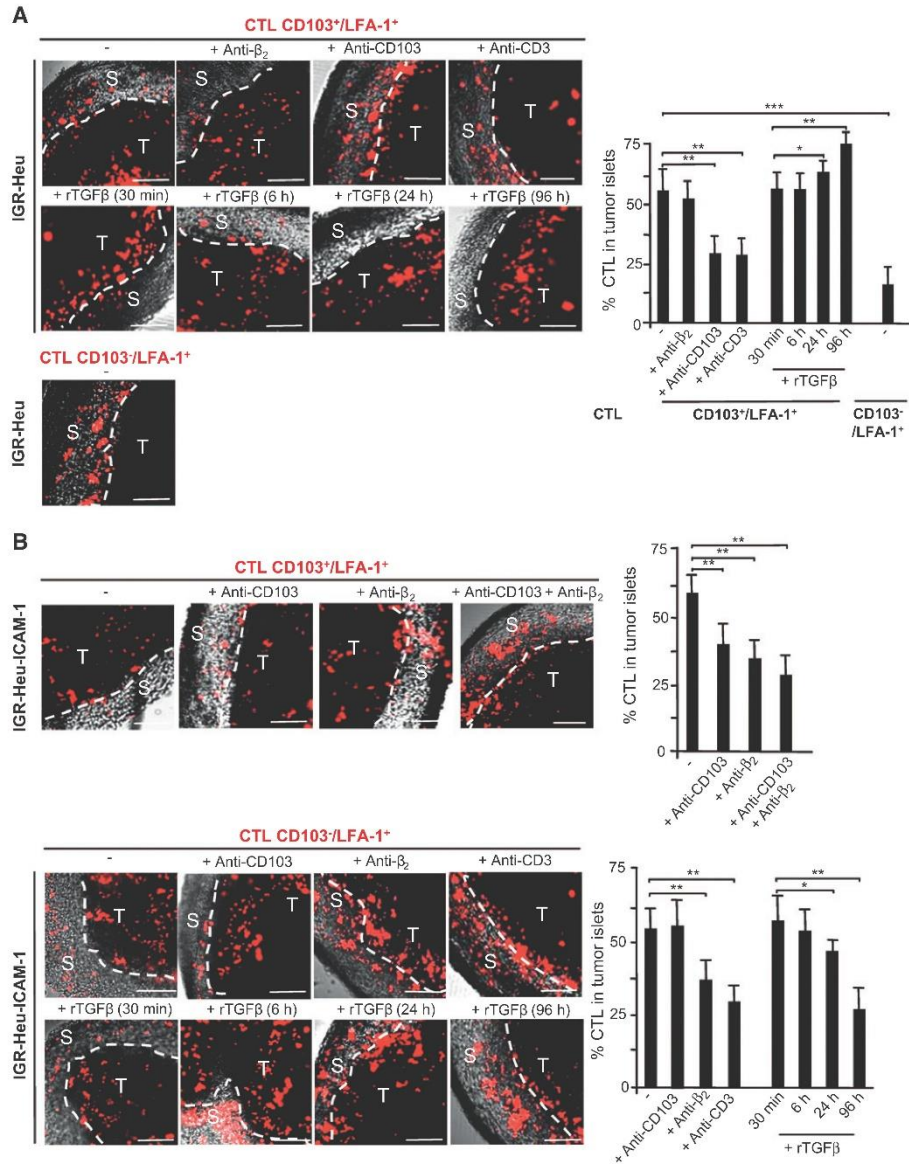


Figure 1. Adhesion and filopodia formation are increased following CD103⁺/LFA-1⁺ T-cell stimulation with rCXCL12 or rTGFβ. A, adhesion to rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc of the TIL clone, untreated or pretreated with rCXCL12 for 30 min, or with rTGFβ for indicated time points, was analyzed by confocal microscopy. rFibronectin-Fc was used as a negative control. Bottom, mean numbers of adherent lymphocytes per field. Adhesion was evaluated by counting adherent lymphocytes stained with TO-PRO-3 iodide. Statistical analyses are from three independent experiments (see Supplementary Table S1). Bars, 100 μm; *, *P* < 0.01; and **, *P* < 0.001. B, T-cell adhesion was increased following treatment of freshly isolated TIL with rTGFβ. Adhesion of CD8⁺ TIL (including up to 60% of CD103⁺ T cells), untreated or pretreated with rTGFβ for 96 h, to rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc. Right, mean numbers of adherent cells per field. Results are from one experiment out of three performed with fresh TIL from three different patients. Bars, 500 μm. C, migratory behavior of CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with rCXCL12 or rTGFβ, seeded on recombinant molecules. Polymerized F-actin was visualized with rhodamine phalloidin. Arrows, filopodia and/or cell protrusions. Bottom, T-cell shape index. Statistical analyses are from three independent experiments. Bars, 5 μm; *, *P* < 0.01; **, *P* < 0.001; and ***, *P* < 0.0001.

Boutet et al.



Hence, experiments were performed to compare the effect of TGF β on T-cell adhesion and the migratory behavior of the CD103⁺/LFA-1⁺ TIL clone Heu171 (8) on immobilized human rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc. The rFibronectin-Fc was included as a negative control. rCXCL12, rCCL5, and rCCL20 chemokines, the respective receptors (CXCR4, CCR5, and CCR6), of which are expressed on the T-cell clone surface, were used as positive controls. Indeed, chemokines can trigger integrin-dependent adhesion of lymphocytes by initiating an inside-out signaling leading to integrin activation (20, 21). Results indicated that T lymphocytes stimulated with rCXCL12 (Fig. 1A), rCCL5, or rCCL20 (Supplementary Fig. S1A), adhered more efficiently to both rE-cadh-Fc and rICAM-1-Fc than untreated cells. Of note, incubation of T cells for a short period of time (30 min) with the three chemokines had no effect on LFA-1 and CD103 integrin expression levels (data not shown). Remarkably, treatment of T lymphocytes with rTGF β induced a sharp increase in T-cell adhesion to rE-cadh-Fc starting from 24 h of culture whereas it inhibited lymphocyte adhesion to rICAM-1-Fc (Fig. 1A). Treatment with rTGF β of CD8⁺ TIL freshly isolated from three independent tumors also induced an increase in T-cell adhesion to E-cadherin-Fc whereas it inhibited adhesion to rICAM-1-Fc (Fig. 1B). Opposing effects of TGF β on the adhesion strength of CD103⁺/LFA-1⁺ TIL clone and CD103⁺/LFA-1⁺ PBL counterpart (clone H32-22) to autologous E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ (IGR-IHeu) and E-cadherin⁻/ICAM-1⁻ (IGR-IHeu-ICAM-1) tumor cells, respectively, were also observed under flow conditions (Supplementary Fig. S1B). These results correlated with upregulation of CD103 expression and, in contrast, downregulation of LFA-1 following T-cell incubation with the cytokine (Supplementary Fig. S2A). Notably, T-cell clones, untreated or pretreated with rTGF β , failed to express detectable levels of the E-cadherin inhibitory receptor KLRG1 (data not shown).

Chemokines generate both pro- and anti-adhesive intracellular signaling events, whose equilibrium is relevant to cell movement (21). Therefore, we analyzed morphological changes in CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes cultured on recombinant molecule-coated surfaces in the absence or presence of rCXCL12, rCCL5, or rCCL20. Compared to untreated T cells, rCXCL12-treated cells overlaid on rE-cadh-Fc or rICAM-1-Fc displayed more active motility behavior characterized by greater polarized cell morphology (Fig. 1C). Indeed, an increase in the percent of cells with larger protrusion sizes was obtained when T lymphocytes were stimulated with rCXCL12 and plated on either of the molecules. Similar results were observed with rCCL5 and rCCL20 (Supplementary Fig. S2B). In contrast, starting from 24 h of treatment, TGF β induced a strong increase in lymphocyte locomotion behavior when T cells were exposed to rE-cadh-Fc, but not to rICAM-1-Fc (Fig. 1C). In addition, live-microscopy imaging revealed that motility was enhanced when T cells were pretreated with rTGF β before culturing them on rE-cadh-Fc, whereas it was compromised when the same pretreated cells were

added onto rICAM-1-Fc (Supplementary Fig. S2C and Movies). These results suggest that TGF β promotes T-cell adhesion and cytoskeleton rearrangement by strengthening the interaction of CD103 with E-cadherin.

TGF β enhances CD103-mediated T-cell recruitment in epithelial tumor islets

Next, experiments were undertaken to assess the influence of CD103 on T-cell recruitment in tumor regions via our previously described approach using tumor slices (19) obtained from E-cadherin⁻ lung tumor cell line, untransfected or transfected with ICAM-1, engrafted into immunodeficient NOD-SCID mice. Fluorescent-labeled autologous CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ CTL were overlaid onto fresh tumor slices generated from either E-cadherin⁻/ICAM-1⁻ or E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumors. Slices were stained with anti-E-cadherin mAb to distinguish epithelial from stromal regions (Supplementary Fig. S3A), and then lymphocytes that infiltrated epithelial tumor regions and the stroma were counted. Results indicate that the CD103⁺/LFA-1⁺ TIL clone was much more efficiently recruited within E-cadherin⁺/ICAM-1⁻ tumor islets than the CD103⁻/LFA-1⁺ PBL clone, which was concentrated within stromal regions (Fig. 2A). Moreover, treatment of the CD103⁻/LFA-1⁺ clone with TGF β enhanced T-cell recruitment in tumor regions starting from 24 h of preincubation. In contrast, treatment of the CD103⁻/LFA-1⁺ PBL clone with TGF β alone was unable to induce CD103 expression (8) and thus it had no effect on T-cell recruitment within tumor islets (data not shown). Recruitment of the TIL clone in tumor regions was dependent on CD103 and TCR engagement, because neutralizing anti-CD103 and anti-CD3 mAb dramatically blocked lymphocyte migration by inhibiting T-cell adhesion to E-cadherin⁻ target cells and peptide-MHC-I complex recognition by TCR, respectively. In contrast, neutralizing anti- β 2 mAb, used as a negative control, had no effect on T-cell distribution (Fig. 2A).

We then analyzed the location of both T-cell clones plated on E-cadherin⁻/ICAM-1⁻ tumor slices and the effect of TGF β on this process. Transfection of tumor cells with ICAM-1 only slightly increased recruitment of the CD103⁻/LFA-1⁺ clone in tumor islets, whereas it strongly enhanced CD103⁺/LFA-1⁺ clone migration (Fig. 2B). Moreover, anti- β 2 and anti-CD3 mAb strongly inhibited PBL clone recruitment, whereas anti-CD103, anti- β 2, or a combination of both mAb blocked TIL clone migration toward tumor regions. Notably, pertussis toxin, a bacterial toxin that blocks signaling from G protein-coupled receptors including chemokine receptors had no effect on T-cell distribution (data not shown). In contrast, treatment of the CD103⁺/LFA-1⁺ clone with TGF β resulted in profound inhibition of T-cell recruitment within E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumor islets, in particular after 96 h of preincubation (Fig. 2B). These results strongly suggest that CD103 is directly involved in T-lymphocyte recruitment in tumor

Figure 2.

Recruitment of CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ lymphocytes within epithelial tumor regions of human lung tumor slices. A, fluorescent-labeled CD103⁺/LFA-1⁺ T cells, untreated or pretreated with neutralizing anti-CD103, anti- β 2, or anti-CD3 mAb, or with rTGF β , were plated on E-cadherin⁻/ICAM-1⁻ tumor (IGR-Heu) slices. Stromal (S) and tumor (T) areas, identified by brightness contrast and confirmed by E-cadherin labeling (see Supplementary Fig. S3A). Lymphocytes were stained with SNARF. Right, percentages of cells inside tumor areas are from three independent experiments. B, CD103⁻/LFA-1⁺ or CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with neutralizing anti-CD103, anti-CD3, or anti- β 2 mAb, or with rTGF β , were overlaid onto E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ (IGR-Heu-ICAM-1) tumor slices. Right, percentages of T cells inside tumor areas are from three independent experiments out of 6. Bars, 100 μ m; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; and ***, $P < 0.0001$.

Boutet et al.

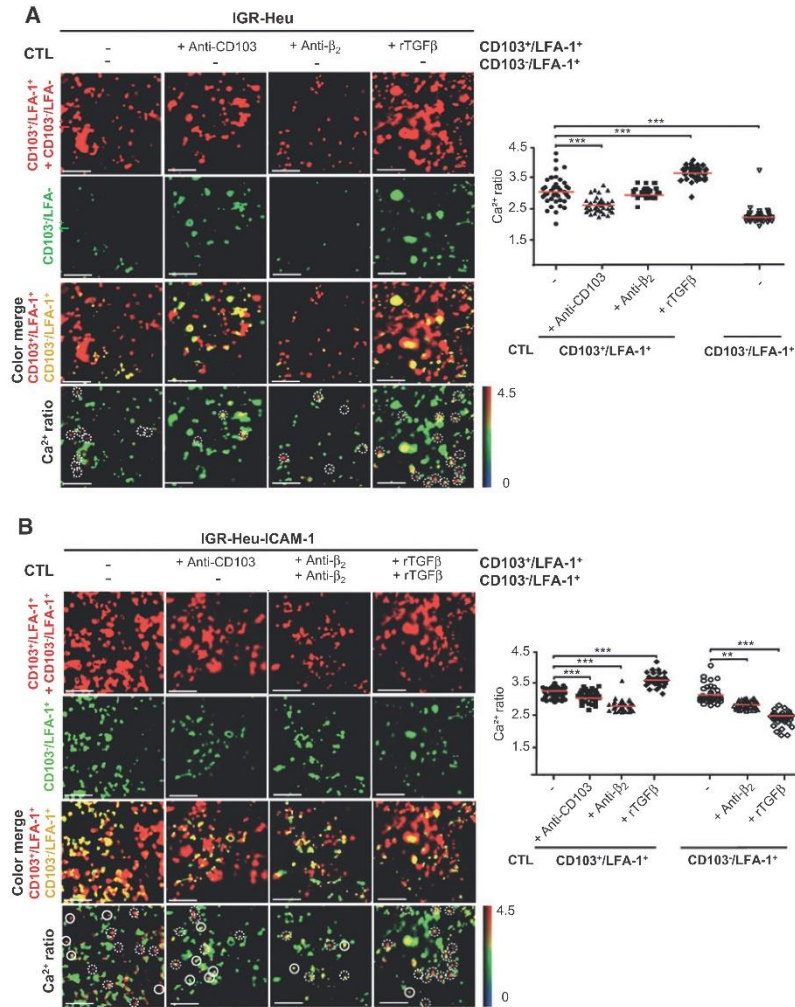
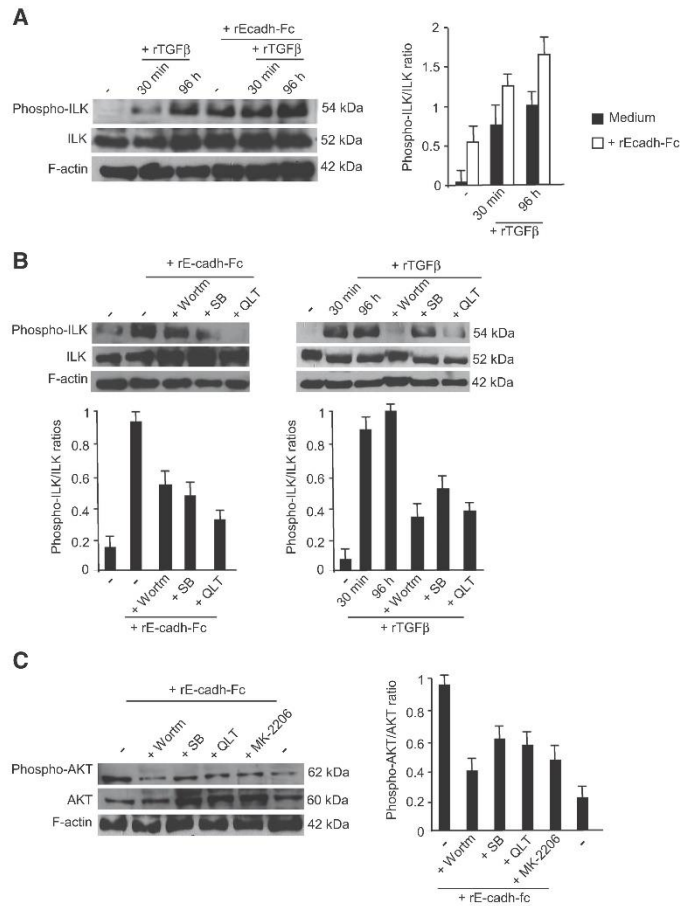


Figure 3. Calcium response of T cells within epithelial islets of lung tumor slices. A, CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ CTL were loaded with Fura-2 probe (top, red). CD103⁺/LFA-1⁺ T cells were also labeled with CMFDA (green) to distinguish them from CD103⁻/LFA-1⁺ cells. Thus, CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes appeared in red, whereas CD103⁻/LFA-1⁺ lymphocytes appeared in yellow (a merge of red and green dyes) in color merge panels. Loaded T cells were added to a tumor slice 1 h before the recording. Calcium response, represented in pseudo-colors (from green, average calcium level to red, strong calcium level), of CD103⁺/LFA-1⁺, untreated or pretreated with neutralizing anti-CD103 or anti- β_2 , or with rTGF β for 96 h, and CD103⁻/LFA-1⁺ lymphocytes within E-cadherin⁻/ICAM-1⁻ (IGR-Heu) tumor areas. White dotted circles correspond to CD103⁺/LFA-1⁺ responding cells. Right, quantification of intracellular Ca²⁺. B, calcium response of CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with neutralizing anti-CD103 or anti- β_2 mAb, or with rTGF β , in tumor islets of E-cadherin⁻/ICAM-1⁻ (IGR-Heu-ICAM-1) slices. White dotted and full circles correspond to CD103⁺/LFA-1⁺ and CD103⁻/LFA-1⁺ responding lymphocytes, respectively. Right, quantification of intracellular calcium response. Statistical analyses are from three independent experiments. Bars, 100 μ m; **, $P < 0.001$; and ***, $P < 0.0001$.

Figure 4. Engagement of CD103 on CD103⁺/LFA-1⁻ lymphocytes with rE-cadh-Fc-induced phosphorylation of ILK and AKT. A, engagement of CD103 with rE-cadh-Fc or treatment of the CD103⁺/LFA-1⁻ clone with TGFβ-induced phosphorylation of ILK. Lymphocytes, untreated or pretreated with rTGFβ for indicated time points, were stimulated with immobilized rE-cadh-Fc and then protein extracts were analyzed by Western blot using anti-phospho-ILK or anti-ILK mAb. F-actin was used as a loading control. Right, normalization of phospho-ILK relative to total ILK. B, Wortmannin (Wortm), SB, and QLT inhibit ILK phosphorylation induced by CD103 engagement with rE-cadh-Fc or rTGFβ stimulation. CD103⁺/LFA-1⁻ lymphocytes were pretreated with PI3K, TGFBR1, or ILK inhibitors and then stimulated with immobilized rE-cadh-Fc or with rTGFβ. T-cell protein extracts were analyzed by Western blot. Bottom, normalization of phospho-ILK relative to ILK. C, Wortmannin, SB, QLT, and MK-2206 inhibit AKT phosphorylation induced by CD103 engagement with rE-cadh-Fc. CD103⁺/LFA-1⁻ lymphocytes were pretreated for 1 h with either of the inhibitors and then stimulated with immobilized rE-cadh-Fc. Protein extracts were analyzed by Western blot using indicated mAb. Right, normalization of phospho-AKT relative to AKT. Statistical analyses are from three independent experiments.



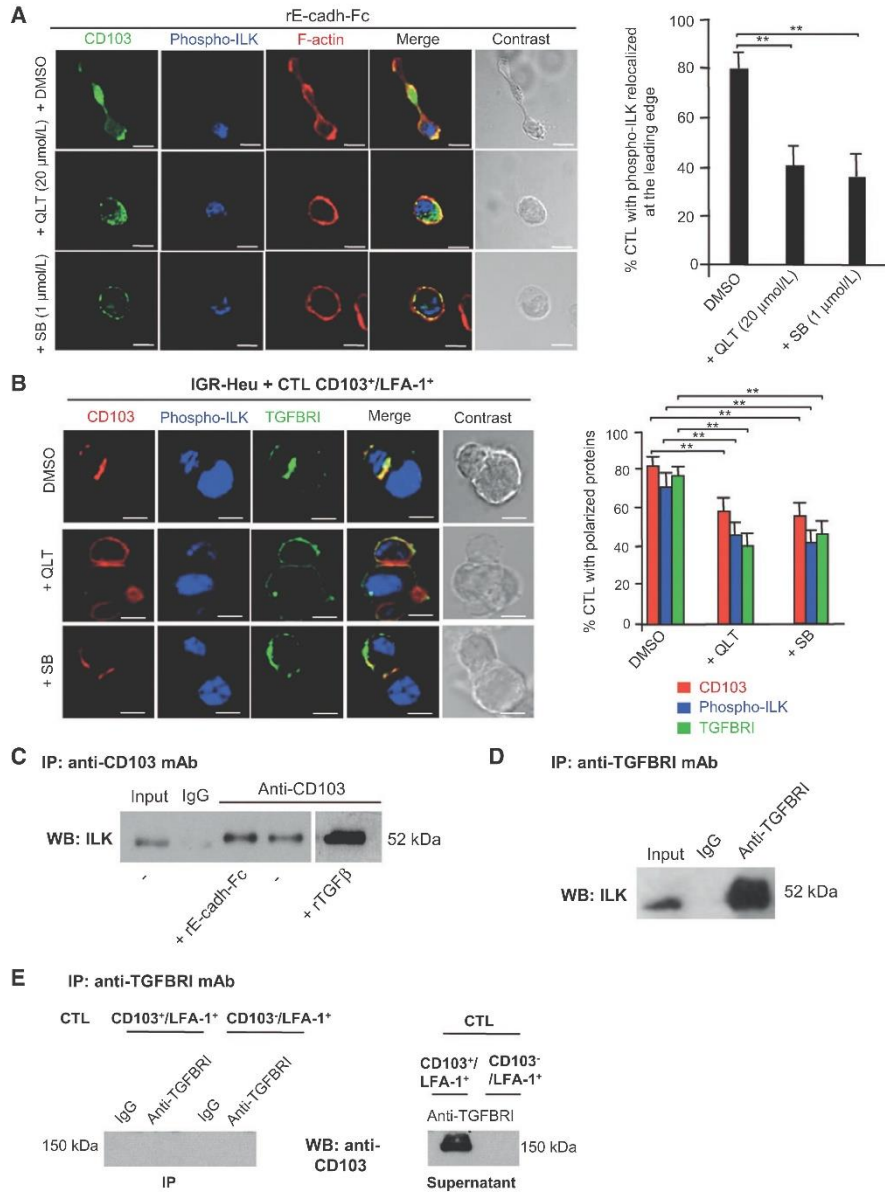
islets and that TGFβ upregulates its functions, whereas it has opposing effects on LFA-1.

TGFβ potentiates intratumoral early signaling of CD103⁺ lymphocytes

Imaging of the intracellular calcium increase is a powerful means of monitoring the dynamics of T-lymphocyte activation. We therefore evaluated the role of CD103 and the influence of TGFβ on the Ca²⁺ response triggered in CTL CD103⁺/LFA-1⁻ and CD103⁻/LFA-1⁺. T-cell clones, untreated or pretreated with rTGFβ, were labeled with Fura-2 (red) to monitor calcium response. The CD103⁺/LFA-1⁻ clone was also labeled with CMFDA fluorescent dye (green; thus appearing in yellow) in order to identify each T-cell population on the same slice. The two

clones were then added simultaneously to tumor slices, untransfected or transfected with ICAM-1. Results indicated that CTL CD103⁺/LFA-1⁻, added to the E-cadherin⁻/ICAM-1⁻ slice and recruited within tumor islets, displayed a much stronger calcium response than CTL CD103⁻/LFA-1⁺ (Fig. 3A). Moreover, neutralizing anti-CD103 induced a decrease in the calcium level of the TIL clone, whereas anti-β2 mAb, used as a negative control, had no effect. Remarkably, treatment of the TIL clone with rTGFβ induced a sharp increase in the T-cell calcium response. An increase in CD103⁺/LFA-1⁻ Ca²⁺ response was also observed when the T-cell clone was pretreated with TGFβ and plated on a monolayer of E-cadherin⁻/ICAM-1⁻ TGR-Heu tumor cells, which was inhibited when T lymphocytes were preincubated with neutralizing anti-CD103 mAb (Supplementary Fig. S3B). In contrast, treatment of

Boutet et al.



the CD103⁺/LFA-1⁺ PBL clone with TGF β alone failed to induce CD103 expression and thus a marginal calcium response was observed when T cells were added to E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumor cells (data not shown).

We then monitored Ca²⁺ signaling of both clones plated on E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumor slices. As expected, a strong calcium response was obtained with the CD103⁺/LFA-1⁺ clone, which was inhibited by both anti-CD103 and anti- β_2 blocking mAb. Transfection of tumor cells with ICAM-1 induced a strong Ca²⁺ increase in the CD103⁺/LFA-1⁺ clone, which was blocked by neutralizing anti- β_2 . Importantly, treatment of the PBL clone with TGF β strongly inhibited early T-cell signaling (Fig. 3B). These results suggest a crucial role of CD103 in regulating TCR-mediated activities within a TGF β -rich tumor ecosystem and that TGF β is involved in the CD103 signaling pathway.

TGF β regulates CD103 activation via ILK phosphorylation

The signaling pathway of CD103 and its contribution to T-cell migration and functions within epithelial tissues are unknown. ILK, a serine/threonine kinase, has been reported to mediate integrin signaling and to play a role in leukocyte recruitment (22) and T-cell chemotaxis (23). Moreover, a role for TGF β in regulating ILK expression and activation has been reported (24). We therefore analyzed the involvement of ILK in CD103 signaling and the effect of TGF β on integrin activation in CD103⁺/LFA-1⁺ CTL. Initial experiments indicated that TGF β upregulated ILK gene transcription starting from 6 h of T-cell clone treatment (Supplementary Fig. S3C). Moreover, stimulation of the clone with immobilized rE-cadh-Fc and/or rTGF β triggered phosphorylation of ILK at Ser 246 (Fig. 4A), which was strongly inhibited by the ILK inhibitor QLT, the TGFBR1 inhibitor SB, the PI3K inhibitor Wortmannin (Fig. 4B), and anti-CD103 mAb (Supplementary Fig. S3D). Notably, inhibition of ILK phosphorylation resulted in a marked decrease in CTL adhesion on immobilized rE-cadh-Fc (Supplementary Fig. S3E). Stimulation of the TIL clone with rE-cadh-Fc also induced phosphorylation of the PKB/AKT at Ser-473, which was strongly inhibited by the AKT inhibitor MK-2206 and QLT, SB, and Wortmannin (Fig. 4C). Of note, incubation of lymphocytes for a short period of time (1 h) with all inhibitors had no effect on integrin expression level and T-cell viability, as checked by CD103 and annexin V labeling, respectively (data not shown).

Next, we evaluated the consequences of CD103 engagement with its ligand on ILK localization in CD103⁺/LFA-1⁺ TIL, plated on a rE-cadh-Fc-coated slide. Results indicate that the CD103-E-cadherin interaction resulted not only in T-cell spreading, but also

in recruitment of phospho-ILK, together with CD103, at the leading edge of migrating CTL presenting a high actin cytoskeleton rearrangement (Fig. 5A). Moreover, ILK and TGFBR1 inhibitors induced a marked decrease in phospho-ILK recruitment at the leading edge. Together, these results suggested that TGFBR1 serine kinase catalyzed, even in the absence of its ligand, phosphorylation of ILK through a PI3K-dependent pathway and that phospho-ILK and phospho-AKT were involved in CD103 signaling.

ILK recruitment and phosphorylation by TGFBR1 triggers binding to CD103

Because the interaction of ILK with β -integrins is important for intracellular signaling, we first monitored the localization of phospho-ILK and TGFBR1 in conjugates formed between CD103⁺/LFA-1⁺ T cells and E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumor cells. Results revealed polarization of phospho-ILK, together with CD103 and TGFBR1, at the IS, which was inhibited by QLT and SB (Fig. 5B), as well as siRNA targeting E-cadherin (Supplementary Fig. S4A). Consistently, shRNA targeting ILK also inhibited CD103 polarization (Supplementary Figs. S4B and S4C) and AKT phosphorylation (data not shown). In contrast, treatment of the TIL clone with rTGF β induced an increase in synaptic relocalization of CD103, phospho-ILK, and TGFBR1 (Supplementary Fig. S4D).

To explore a potential link between TGFBR1, phospho-ILK, and CD103, we searched for physical interactions between these proteins. Therefore, we performed immunoprecipitation experiments using anti-CD103 or anti-TGFBR1 mAb and immunoblotting with anti-ILK. Results revealed that ILK bound to CD103 (Fig. 5C) and TGFBR1 (Fig. 5D), and that TGF β , and to a lesser extent rE-cadh-Fc, enhanced ILK linking to CD103. Notably, no direct interaction between CD103 and TGFBR1 was observed, because CD103 was detected only in the supernatant of immunoprecipitation with anti-TGFBR1 (Fig. 5E). These results further support the hypothesis that the interaction of TGF β with its receptors induces recruitment and phosphorylation of ILK by TGFBR1 and its subsequent binding to the CD103 intracellular domain, resulting in AKT phosphorylation and thereby initiating integrin inside-out signaling.

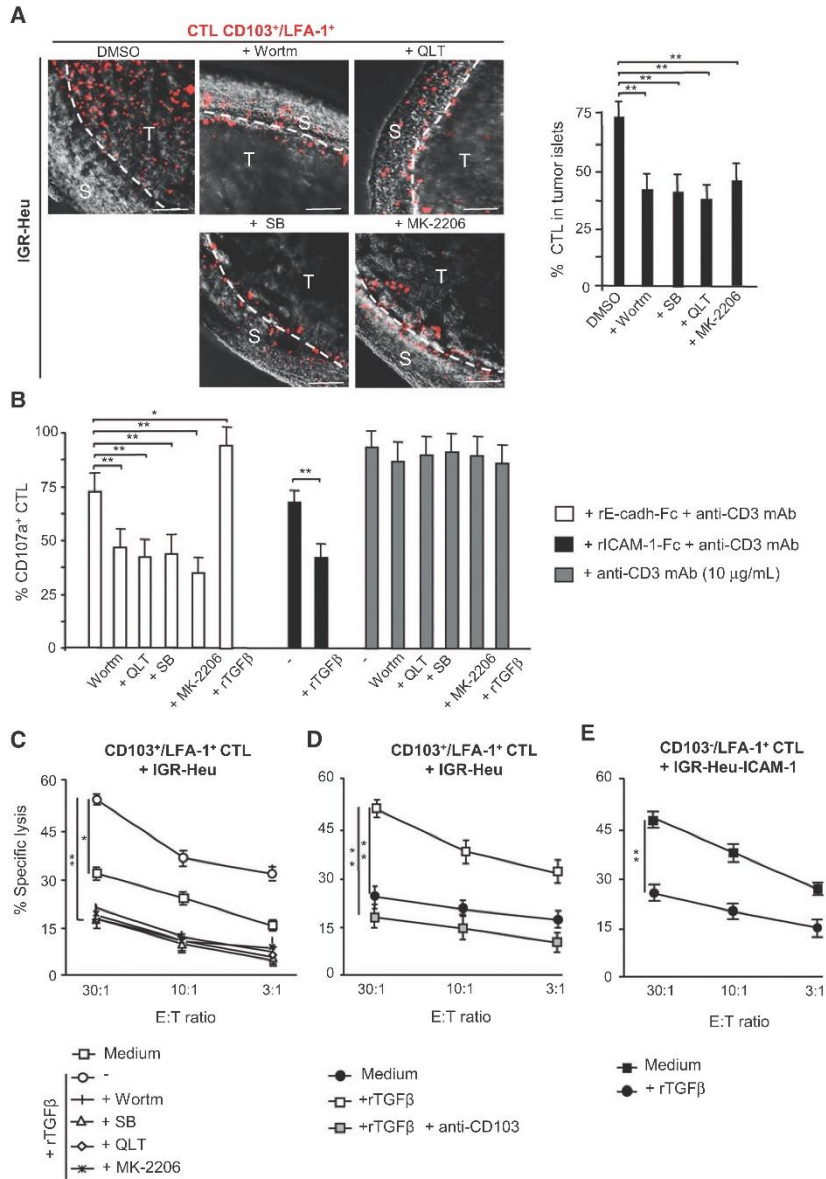
TGF β regulates CD103-dependent CTL activities via PI3K-ILK-AKT pathway

Experiments were then conducted to evaluate the contribution of PI3K-ILK-AKT pathway in CD103-mediated T-cell functions. Using the tumor slice system, results indicated that Wortmannin, SB, QLT, and MK-2206 inhibited T-cell recruitment in epithelial

Figure 5.

Engagement of CD103 on the T-cell surface with E-cadherin resulted in polarization of phospho-ILK and its subsequent binding to CD103. A, engagement of CD103 with immobilized rE-cadh-Fc resulted in polarization of phospho-ILK at the leading edge. CD103⁺/LFA-1⁺ T cells, untreated or pretreated with QLT or SB, were plated on plastic-coated rE-cadh-Fc, and then lymphocytes were analyzed for intracellular protein distribution by confocal microscopy using anti-phospho-ILK, anti-CD103, or anti-F-actin. Right, percentages of T cells displaying polarized phospho-ILK at the leading edge ($n = 40$). B, the CD103-E-cadherin interaction induced recruitment of phospho-ILK at the IS. Conjugates between CD103⁺/LFA-1⁺ CTL, untreated or treated with QLT or SB, and IGR-Heu tumor cells were analyzed for CD103, phospho-ILK, and TGFBR1 polarization. Right, percentages of cells displaying polarized proteins ($n = 35$). Statistical analyses are from one experiment out of three. Bars, 5 μ m. **, $P < 0.001$. C, ILK binds to CD103. Protein extracts from CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes, stimulated with immobilized rE-cadh-Fc for 30 min or rTGF β for 96 h, were immunoprecipitated (IP) using anti-CD103 mAb and then immunoblotted (WB) with anti-ILK. An IgG negative control was included. D, TGFBR1 binds to ILK. CD103⁺/LFA-1⁺ cells were treated with rTGF β and then protein extracts were immunoprecipitated with anti-TGFBR1, followed by immunoblotting with anti-ILK. Results are from one experiment out of three. E, TGFBR1 does not bind to CD103. Protein extracts from CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes were immunoprecipitated with anti-TGFBR1 mAb and then immunoblotted with anti-CD103. The CD103⁺/LFA-1⁺ clone and IgG were used as negative controls. Right, CD103 detected in the supernatant of CD103⁺/LFA-1⁺ CTL.

Boutet et al.



tumor islets (Fig. 6A). We then analyzed the effect of all the inhibitors and the influence of TGF β on CD103-dependent T-cell clone degranulation. As shown in Fig. 6B, CD103⁺/LFA-1⁺ T cells cultured with rTGF β and stimulated with a combination of anti-CD3 plus rE-cadh-Fc expressed higher surface levels of CD107a than T cells exposed to a combination of anti-CD3 and rICAM-1-Fc. Moreover, Wortmannin, SB, QLT, and MK-2206 induced a decrease in T-cell degranulation triggered by a combination of anti-CD3 plus rE-cadh-Fc, whereas they had no effect on CD107a expression induced by a high dose of anti-CD3. Consistently, SB and QLT strongly inhibited cytotoxic granule polarization at the contact area between CD103⁺/LFA-1⁺ CTL and rE-cadh-Fc-coupled beads (Supplementary Fig. S5A). In addition, although TGF β inhibited granzyme B polarization at the contact area between the TIL clone and rICAM-1-Fc-coupled beads, it had no effect on serine protease relocalization at the contact zone with rE-cadh-Fc-coated beads.

We then evaluated the effect of TGF β , PI3K, TGFBR1, phospho-ILK, and phospho-AKT inhibitors on T-cell clone-mediated cytotoxicity toward target cells. Incubation of the CD103⁺/LFA-1⁺ clone with rTGF β enhanced E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ IGR-Heu tumor cell killing (Fig. 6C), which was inhibited in the presence of neutralizing anti-CD103 (Fig. 6D), whereas Wortmannin, SB, QLT, and MK-2206 inhibited target cell lysis (Fig. 6C). Notably, all inhibitors had no effect on T-cell clone-mediated CD3-redirection cytotoxicity of the P815 target (Supplementary Fig. S5B). In contrast, culture of the CD103⁺/LFA-1⁺ CTL clone in the presence of TGF β dramatically inhibited E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ IGR-Heu-ICAM-1 target cell lysis (Fig. 6E). Notably, TGF β had no effect on granzyme B expression levels in both T-cell clones (data not shown). These results further emphasize the role of PI3K, TGFBR1, phospho-ILK, and phospho-AKT/PKB in CD103 signaling and the positive effect of TGF β in antitumor CTL-mediated activities.

Discussion

In this report, we identified CD103 and its ligand E-cadherin as important adhesion molecules stimulating recruitment and effector functions of activated CD8⁺/CD103⁺ TIL inside human lung tumors. In agreement with our previous studies, we also show that CD8⁺/CD103⁺ T cells accumulate preferentially within the tumor stroma and display inefficient antitumor activities (19). Along the same line, it has been reported that mouse CD103⁺ T cells failed to infiltrate allograft islets, suggesting that CD103 promotes intragraft migration of CD8⁺ effectors into epithelial islets (25). Our data are consistent with a key role for CD103 in promoting entry of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells into epithelial tumor islets and in triggering antitumor T-cell functions. Recognition of tumor antigen by TCR also plays an impor-

tant role, because anti-CD3 mAb inhibited T-cell recruitment into tumor regions. It is possible that CD103 contributes to intratumoral scanning of target cells for cognate antigen recognition.

CD103 and LFA-1 are the predominant integrins expressed by TIL and both are likely involved in T-cell adhesion and migration within and toward epithelial tumors, respectively. Indeed, we show here that LFA-1, through an interaction with ICAM-1, also induced T-cell infiltration within tumor nests. However, tumors often express low levels of ICAM (26) and produce high amounts of TGF β (27), thus altering LFA-1 expression and functions (ref. 28 and this study). Indeed, this cytokine shifted the integrin expression profile of tumor-specific TIL from LFA-1^{high}/CD103^{low} to LFA-1^{low}/CD103^{high}. Thus, CD103 most likely corresponds to an important integrin for adjusting T-cell adhesion and migratory potential in the tumor ecosystem, where TGF β is abundant. Along this line, it has been reported that murine CD103 determines cell shape and motility, and confers the ability to move in an actin-polymerization-dependent manner (29). These results suggest that CD103-mediated cell movement probably involves signaling interactions with components of the cytoskeleton. Likewise, we show here that human CD103 confers the capacity to CD8⁺ T cells to form protrusions/filopodia in an E-cadherin-dependent fashion. Moreover, TGF β strongly optimizes T-cell adhesion and motility by enhancing CD103 expression levels and initiating intracellular signals, resulting in integrin activation.

TGF β is known to inhibit cell growth in benign cells but promotes progression in cancer cells (30). Moreover, TGF β signaling in peripheral T lymphocytes is essential for tolerance and homeostasis by restraining TCR activation-dependent Th1, cytotoxic, and NKT cell differentiation program (31, 32). This cytokine, produced by stromal and tumor cells, is also described as an immunosuppressive factor used by malignant cells to escape from the immune response and to compromise CTL activities (33). Paradoxically, TGF β is involved in promoting antitumor CD8⁺ T-cell effector functions within epithelial tumors by inducing CD103 upon TCR engagement and by adjusting its expression levels. TGF β also plays an essential role in the formation and long-term persistence of tissue-resident memory T cells (T_{RM}), at least in part via induction of CD103 (34). Importantly, our data indicate that TGF β also contributes to T-cell migration toward epithelial tumor islets and subsequent cancer cell destruction. This paradoxical effect of TGF β on T-cell functions is most likely associated with the use in this study of CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes whereas most of the previous studies were based on peripheral T cells, which generally express a CD103⁺/LFA-1⁺ phenotype. Consistently, we show here that TGF β is responsible for arrest of LFA-1-dependent T-cell migration within stromal regions by preventing integrin expression and functions. It has been reported that TGF β inhibits phosphorylation of Erk and, thereby, LFA-1-mediated

Figure 6.

Phospho-ILK and phospho-AKT are involved in CTL activities. A, recruitment of fluorescent-labeled CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with Wortmannin, SB, QLT, or MK-2206 inhibitors, within epithelial tumor regions of lung tumor (IGR-Heu) slices. Stromal (S) and tumor (T) areas were identified by brightness contrast. Right, percentages of T cells inside tumor areas were determined from three independent experiments. Bars, 100 μ m. B, CD103⁺/LFA-1⁺ lymphocytes, untreated or pretreated with rTGF β for 96 h or with indicated inhibitors for 1 h, were incubated with a combination of anti-CD3 plus a suboptimal concentration of anti-CD3 mAb. A combination of a suboptimal concentration of anti-CD3 plus rICAM-1-Fc or a high concentration of anti-CD3 was used as controls. Data correspond to percentages of CD107a⁺ lymphocytes from two independent experiments out of three. C, cytotoxic activity of CD103⁺/LFA-1⁺ CTL, untreated or pretreated with rTGF β and then with indicated inhibitors, toward autologous E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ (IGR-Heu) tumor cells. D, cytotoxicity of CD103⁺/LFA-1⁺ CTL, untreated or pretreated with rTGF β and then either left in medium or preincubated with neutralizing anti-CD103 mAb, toward autologous E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ tumor cells. E, cytotoxic activity of CD103⁺/LFA-1⁺ CTL, untreated or pretreated with rTGF β , toward autologous E-cadherin⁺/ICAM-1⁺ (IGR-Heu-ICAM-1) tumor cells. *, $P < 0.01$ and **, $P < 0.001$.

Boutet et al.

T-cell adhesion and chemotaxis (28, 35). In contrast, this cytokine contributes to CD103 signaling by upregulating ILK expression and inducing its phosphorylation. TGF β initiates signaling by binding to TGFBR, leading to formation of a hetero-tetrameric complex composed of TGFBR1 and TGFBR2 dimers, in which TGFBR2 catalyzes phosphorylation of the cytoplasmic domain of TGFBR1 (36). In addition to the Smad pathway, TGF β utilizes multiple non-Smad pathways, including PI3K/AKT pathway, to regulate a wide range of cell functions (37). We show here that TGFBR1 recruits and phosphorylates ILK, which then binds to the α_E subunit of CD103, leading to AKT/PKB phosphorylation and thus initiating integrin inside-out signaling. It has been reported that ILK associates with TGFBR2 and that *ILK* gene inactivation results in a decrease in TGFBR2 signaling (38).

ILK is a serine-threonine kinase that interacts with intracytoplasmic domains of β_1 and β_3 integrins and cytoskeletal-associated proteins (39). This kinase is associated with integrin activation and intracellular signaling (40), and has been reported to mediate actin filament rearrangement and tumor cell migration and invasion through PI3K/AKT/Rac1 signaling (41). Indeed, ILK directly binds to AKT/PKB and contributes to its phosphorylation, thereby regulating several signaling pathways including spreading and migration (42). Consistently, our results indicated that ILK is directly involved in CD103 intracellular signaling by promoting phosphorylation of AKT/PKB and that the CD103-E-cadherin interaction induced phosphorylation of ILK and its subsequent polarization at the leading edge of migrating T cells. Implication of ILK in both inside-out and outside-in integrin signaling pathways (43, 44) and in β_2 integrin-mediated polarization of lytic granules toward the target have also been reported (45). Our data suggest that ILK functions as a key component of a protein complex formed upon CD103 clustering that may connect extracellular ligands with the T-cell intracellular signaling complex. We also show here that TGF β corresponds to an important factor that not only activates α_E (CD103) subunit expression, but also locally regulates integrin activation and signaling via the ILK and AKT/PKB pathway. This leads to strengthening of CD103-E-cadherin interaction, thereby initiating outside-in signaling that promotes CD103-mediated T-cell functions such as T-cell spreading, migration, and cytotoxicity.

Overall, our data expand our knowledge of CD8⁺ T-cell locomotion within epithelial tissues and provide more insight into

mechanisms that promote CD103 signaling within a TGF β -rich tumor microenvironment. Thus, CD103-E-cadherin adhesive interactions regulate multiple local T-cell activities, including adhesion, Ca²⁺ response, and recruitment within epithelial tumor regions. This integrin is also involved in T-lymphocyte proliferation, cytokine secretion, cytotoxic IS maturation, and killing of epithelial target cells (8, 9, 14, 46). These findings are consistent with a general role of CD103 in promoting CD8 T-cell immune responses within epithelial tumors and may contribute to optimizing current T-cell-based cancer immunotherapy strategies.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Boutet, F. Mami-Chouaib
Development of methodology: N. Th  ret, E. Donnadi  u, F. Mami-Chouaib
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M. Boutet, L. Gauthier, M. Leclerc, G. Gros, V. de Montpreville, E. Donnadi  u, F. Mami-Chouaib
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M. Boutet, L. Gauthier, E. Donnadi  u, F. Mami-Chouaib
Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Boutet, L. Gauthier, N. Th  ret, F. Mami-Chouaib
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): F. Mami-Chouaib
Study supervision: F. Mami-Chouaib

Acknowledgments

The authors thank S. Salom  -Desmoulez for her help with confocal microscopy.

Grant Support

This work was supported by grants from the INSERM, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Institut National du Cancer (INCa), and Ligue contre le Cancer. M. Boutet was a recipient of a fellowship from Canc  rop  le IDF and Gustave Roussy (SIRIC-SOCRATE).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received June 4, 2015; revised December 18, 2015; accepted January 3, 2016; published OnlineFirst February 26, 2016.

References

- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960-4.
- Pribila JT, Quale AC, Mueller KL, Shimizu Y. Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 2004;22:157-80.
- Epler JA, Liu R, Shimizu Y. From the ECM to the cytoskeleton and back: how integrins orchestrate T cell action. *Dev Immunol* 2000;7:155-70.
- van Kooyk Y, Figdor CG. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:542-7.
- Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EG, et al. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 2000;13:759-69.
- Dustin MI, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989;341:619-24.
- Lek HS, Morrison VI, Conneely M, Campbell PA, McGloin D, Kliche S, et al. The spontaneously adhesive leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) integrin in effector T cells mediates rapid actin- and calmodulin-dependent adhesion strengthening to ligand under shear flow. *J Biol Chem* 2013;288:14698-708.
- Le Floch A, Jalil A, Vergnon I, Le Maux Chansac B, Lazar V, Bismuth C, et al. Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *J Exp Med* 2007;204:559-70.
- Franciszewicz K, Le Floch A, Boutet M, Vergnon I, Schmitt A, Mami-Chouaib F. 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 Res* 2013;73:617-28.
- Le Floch A, Jalil A, Franciszewicz K, Validire P, Vergnon I, Mami-Chouaib F. Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via

- a phospholipase C-gamma-dependent pathway. *Cancer Res* 2011;71:328–38.
11. Wagner N, Lohler J, Kunkel EJ, Ley K, Leung E, Krissansen G, et al. Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 1996;382:366–70.
 12. Lefrançois L, Parker CM, Olson S, Muller W, Wagner N, Schon MP, et al. The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med* 1999;189:1631–8.
 13. Schon MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch TIC, Agace WW, et al. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 1999;162:6641–9.
 14. Franciszkiewicz K, Le Floch A, Jalil A, Vigant F, Robert T, Vergnon I, et al. Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention. *Cancer Res* 2009;69:6249–55.
 15. Webb JR, Milne K, Watson P, Deleeuw RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:434–44.
 16. Djenedi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Maurice C, de Montpreville V, et al. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol* 2015;194:3475–86.
 17. Parker CM, Cepek KL, Russell GJ, Shaw SK, Posnett DN, Swarting R, et al. A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1924–8.
 18. Mokrani M, Rilbi J, Bluteau D, Bismuth G, Mami-Chouaib F, Smad and NFAT pathways cooperate to induce CD103 expression in human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 2014;192:2471–9.
 19. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* 2012;122:899–910.
 20. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2005;5:546–59.
 21. Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* 2002;186:37–46.
 22. Friedrich EB, Sinha S, Li L, Dedhar S, Force T, Rosenzweig A, et al. Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. *J Biol Chem* 2002;277:16371–5.
 23. Liu E, Sinha S, Williams C, Cyrille M, Heller E, Snapper SB, et al. Targeted deletion of integrin-linked kinase reveals a role in T-cell chemotaxis and survival. *Mol Cell Biol* 2005;25:11145–55.
 24. Ianji B, Melchior C, Gouon V, Vallar L, Kieffer N. Autocrine TGF-beta-regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in IT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int J Cancer* 1999;83:255–62.
 25. Feng Y, Wang D, Yuan R, Parker CM, Farber DL, Hadley GA. CD103 expression is required for destruction of pancreatic islet allografts by CD8(+) T cells. *J Exp Med* 2002;196:877–86.
 26. Passlick B, Pantel K, Kubuschok B, Angstwurm M, Neher A, Thetter O, et al. Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: association with early lymphatic spread of tumour cells. *Eur J Cancer* 1996;32A:141–5.
 27. Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TH, and PBI of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 1998;77:7–12.
 28. Sela U, Mauermann N, Hershkovitz R, Zinger H, Dayan M, Cahalon L, et al. The inhibition of autoreactive T cell functions by a peptide based on the CDR1 of an anti-DNA autoantibody is via TGF-beta-mediated suppression of LFA-1 and CD44 expression and function. *J Immunol* 2005;175:7255–63.
 29. Schlickum S, Sennefelder H, Friedrich M, Harms G, Lohse MJ, Kilshaw P, et al. Integrin alpha E(CD103)beta 7 influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion. *Blood* 2008;112:619–25.
 30. Zhang Q, Yu N, Lee C. Mysteries of TGF-beta Paradox in Benign and Malignant Cells. *Front Oncol* 2014;4:94.
 31. Li MO, Sanjabi S, Havell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006;25:455–71.
 32. Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 2006;25:441–54.
 33. Thomas DA, Massagué J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 2005;8:369–80.
 34. Gebhardt T, Mackay LK. Local immunity by tissue-resident CD8(+) memory T cells. *Front Immunol* 2012;3:340.
 35. Sela U, Hershkovitz R, Cahalon L, Lider O, Mozes E. Down-regulation of stromal cell-derived factor-1alpha-induced T cell chemotaxis by a peptide based on the complementarity-determining region 1 of an anti-DNA autoantibody via up-regulation of TGF-beta secretion. *J Immunol* 2005;174:302–9.
 36. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685–700.
 37. Zhang YL. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009;19:128–39.
 38. Vi L, Boo S, Sayedyahosseini S, Singh RK, McLean S, Di Guglielmo GM, et al. Modulation of type II TGF-beta receptor degradation by integrin-linked kinase. *J Invest Dermatol* 2015;135:885–94.
 39. Hannigan GE, Leung-Iagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MC, Radeva G, Filmus J, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996;379:91–6.
 40. Honda S, Shirohani-Ikejima II, Tadokoro S, Maeda Y, Kinoshita T, Tomiyama Y, et al. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood* 2009;113:5304–13.
 41. Qian Y, Zhong X, Flynn DC, Zheng JZ, Qiao M, Wu C, et al. ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene* 2005;24:3154–65.
 42. Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fassler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:20–31.
 43. Grashoff C, Aszodi A, Sakai T, Hunziker EB, Fassler R. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep* 2003;4:432–8.
 44. Stevens JM, Jordan PA, Sage T, Gibbins JM. The regulation of integrin-linked kinase in human platelets: evidence for involvement in the regulation of integrin alpha 2 beta 1. *J Thromb Haemost* 2004;2:1443–52.
 45. Zhang M, March ME, Lane WS, Long EO. A signaling network stimulated by beta2 integrin promotes the polarization of lytic granules in cytotoxic cells. *Sci Signal* 2014;7:ra96.
 46. Kutlesa S, Wessels JJ, Speiser A, Steiert I, Muller CA, Klein G. E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 23):4505–15.

Titre : Rôle de la Neuropiline-1 dans les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 antitumoraux

Mots clés : Neuropiline-1, lymphocyte T CD8, épuisement, cancer, immunothérapie

Résumé : De récents progrès dans la compréhension de la régulation de l'interaction moléculaire entre les lymphocytes T CD8 (LT CD8) et les cellules tumorales ont donné lieu à de nouvelles immunothérapies contre le cancer. En effet, les anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 et anti-PD-1, ciblant des récepteurs inhibiteurs à la surface des LT CD8, ont démontré des bénéfices de survie dans de nombreux cancers. Malheureusement, seule une partie des patients répond à ces traitements. Il est donc crucial de caractériser l'influence d'autres facteurs moléculaires régulant la migration et les activités fonctionnelles des LT CD8 afin d'améliorer les traitements actuels du cancer. Un candidat potentiel impliqué dans cette immunosuppression est le récepteur Neuropiline-1 (Nrp-1), qui a été initialement identifié dans le système nerveux. Nous avons identifié une large population de LT CD8 infiltrant le mélanome murin B16F10, qui exprime des niveaux élevés de Nrp-1. La

présence de cette population augmente pendant la croissance tumorale, mais reste indétectable dans les organes lymphoïdes (rate et ganglion lymphatique drainant la tumeur). De plus, les LT CD8 infiltrant la tumeur exprimant la Nrp-1 montrent des caractéristiques d'épuisement. En parallèle, l'inhibition de la Nrp-1 avec un anticorps neutralisant augmente la capacité des LT CD8 à migrer, et à tuer les cellules tumorales autologues *ex vivo*. D'autre part, l'inhibition de la Nrp-1 *in vivo* agit en synergie avec la neutralisation du récepteur PD-1 pour le contrôle de la croissance tumorale et l'amélioration des fonctions effectrices des LT CD8. Mes résultats montrent donc comment le microenvironnement tumoral induit l'expression de la Nrp-1 sur les LT CD8 et comment ce récepteur neuronal peut participer à la régulation des fonctions effectrices des LT CD8 antitumoraux, avec de potentielles implications comme cible pour une immunothérapie.

Title: Immuno-modulatory effects of neuropilin-1 on antitumor CD8 T cell functions

Keywords: Neuropilin-1, CD8 T cell, exhaustion, cancer, immunotherapy

Abstract: Recent advances in understanding the regulation of molecular interaction between CD8 T cell and tumor cells gave rise to novel cancer immunotherapies. Indeed, monoclonal antibodies against CTLA-4 and PD-1 (mAb), targeting inhibitory receptors on the surface of CD8 T cells, have demonstrated survival benefits in many cancers. Unfortunately, only a fraction of patients responds to these treatments. Therefore, it is crucial to characterize the influence of additional molecular factors regulating the migration and the functional activities of CD8 T cells, in order to improve current cancer treatments. A potential candidate involved in this immunosuppression function is the Neuropilin-1 (Nrp-1) which was originally identified in the nervous system. We identified a large subset of CD8 T cells infiltrating B16F10 melanoma

which expresses high levels of Nrp-1. The frequency of Nrp-1⁺ CD8 T cells increased during tumor growth, but was undetectable in lymphoid organs (spleen and tumor-draining lymph node). Moreover, Nrp-1⁺ CD8 tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) displayed features of T cell exhaustion. Importantly, blocking of Nrp-1 with a neutralizing mAb, increases the capacity of CD8 T cells to migrate and to kill autologous tumor cells. In addition, the blockade of Nrp-1 *in vivo* acts synergistically with the neutralization of the inhibitory receptor PD-1 to control tumor growth and restore TIL function. Our findings show how the tumor microenvironment induces Nrp-1 expression on CD8 T cells and how this neuronal receptor may participate in regulating antitumor CD8 T cell response, with potential implications as a target for immunotherapeutic intervention.