



HAL
open science

Etude du rôle du TGF- β dans le contrôle de la réactivité des lymphocytes T contre les antigènes tumoraux de faible affinité

Ossama Labiad

► To cite this version:

Ossama Labiad. Etude du rôle du TGF- β dans le contrôle de la réactivité des lymphocytes T contre les antigènes tumoraux de faible affinité. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10019 . tel-04460105

HAL Id: tel-04460105

<https://theses.hal.science/tel-04460105>

Submitted on 15 Feb 2024

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.



**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N°340 ED BMIC
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

Discipline : Immunologie

Soutenue publiquement le 22/02/2023, par :
Ossama LABIAD

**Etude du rôle du TGF- β dans la réponse
anti-tumorale des lymphocytes T CD8**

Devant le jury composé de :

BERCOVICI, Nadège	Chargée de Recherche, Paris	Rapporteure
TARTOUR, Eric	Professeur des Universités/PH, Paris	Rapporteur
HIVROZ, Claire	Directrice de Recherche, Paris	Examinatrice
MOYRET-LALLE, Caroline	Professeure des Universités, Lyon 1	Présidente
CAUX, Christophe	Directeur de Recherche, CRCL Lyon	Examineur
MARIE, Julien	Directeur de Recherche, CRCL Lyon	Directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierrer CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice Provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Serment doctoral d'intégrité scientifique

« En présence de mes pairs. « Parvenu(e) à l'issue de mon doctorat en Immunologie , et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats. »

Table des matières

Serment doctoral d'intégrité scientifique	3
Résumé en Français	7
Summary	8
Laboratoire d'accueil	9
Remerciements	10
Liste des abréviations	14
Liste des figures	16
INTRODUCTION	18
I- Les lymphocytes T	19
1) Ontogénie des lymphocytes T	19
A Précurseurs lymphoïdes	20
B PréT	20
C Réarrangement du TCR → protéines RAG	22
D Sélection et maturation dans le thymus	26
2) Activation des LTs	29
A La reconnaissance antigénique	29
i Organes lymphoïdes secondaires	29
ii Cellules présentatrices d'antigènes	30
iii Présentation du peptide/CMH et activation du lymphocyte	32
a CMH	32
b Reconnaissance et stabilisation du complexe CMH-peptide et TCR	36
c Signalisation du TCR	36
- Les protéines adaptatrices de la signalisation du TCR	45
- Voie de la PLC γ 1	46
B Les signaux de co-stimulation	47
i Les signaux activateurs	48
a CD28	48
b 4-1BB	49
c GITR	50
ii Les signaux répresseurs de l'activation	50
a CTLA-4	50
b PD-1	51

C Les cytokines -----	52
i IL-2 -----	52
ii IL-12 -----	53
iii Interférons de type 1 -----	54
II- Lymphocytes T et cancer -----	56
1) Fonctions effectrices anti-cancéreuses des LTs CD8 -----	56
A Fonctions cytotoxiques -----	56
i La voie des perforine-granzyme -----	57
ii La voie Fas-FasL (CD95 – CD95L) -----	58
iii Via la production de cytokines telles que le TNF- α et l'IFN- γ -----	58
2) Stratégie d'échappement de la tumeur -----	60
3) L'immuno-surveillance -----	62
A Lieu peu immunogène -----	65
i Tumeurs chaudes et froides -----	65
ii Pour les tumeurs dites chaudes -----	67
B Les lymphocytes T régulateurs répresseurs de l'activité cytotoxique -----	68
4) TGF- β , une cytokine régulatrice de la réponse T anti cancer -----	70
A Production -----	70
B Activation -----	73
C Signalisation -----	76
III- Action du TGF- β sur les LTs -----	79
1) Action du TGF- β au niveau de la sélection thymique -----	79
2) Effet du TGF- β sur la différenciation des LTs -----	80
3) Effet du TGF- β sur la réponse effectrice -----	80
Objectifs de la thèse -----	85
RESULTATS -----	88
Article 1 : Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin $\alpha\beta 8$ -mediated TGF- β activation -----	89
Article 2 : TGF- β Increases TCR Activation Threshold by Cancer Cell Antigens Allowing Weak Immunogenic Cancer Cell Progression -----	117
References -----	118
CONCLUSIONS -----	153
DISCUSSION ET PERSPECTIVES -----	155
1) Les LTs régulateurs itg $\beta 8^{\text{pos}}$ -----	156
(i) Origine des LTrégs itg $\beta 8^{\text{pos}}$ -----	156
(ii) Effets de l'itg $\beta 8$ au niveau de la réponse immunitaire -----	159

2) Les effets du TGF- β sur la signalisation du TCR -----	159
(i) LCK maestro de l'activation des TCRs -----	159
(ii) Régulation du maestro-----	161
3) Impact du du TGF- β sur les LTs à l'état naïf-----	162
4) Quelques limites-----	164
5) Application en clinique/ Perspectives cliniques -----	165
(i) Le cas de la protéine FAK -----	165
(ii) Blocage de la voie de signalisation du TGF- β -----	166
a- Ciblage de la forme inactive du TGF- β -----	166
b- Blocage de la signalisation du TGF- β par la capture-----	166
(ii) Blocage de l'effet du TGF- β au niveau cellulaire -----	167
(iii) Essais cliniques -----	168
REFERENCES-----	173

Résumé en Français

Les tumeurs solides mettent en place un grand nombre de stratégies afin de contourner le système immunitaire et se maintenir dans l'organisme. Parmi cet arsenal, la cytokine Transforming Growth Factor beta (TGF- β) est considérée comme un des acteurs les plus puissants, notamment sur les lymphocytes T CD8. Ce polypeptide, abondant au sein des tumeurs, est sécrété sous forme inactive, sans capacité de liaison à son récepteur. L'objectif de mon travail de thèse a été double. (i) Comprendre comment l'activation du TGF- β a lieu au sein du micro-environnement tumoral et (ii) comprendre l'action du TGF- β sur les lymphocytes T CD8 intra-tumoraux. Ainsi, nos travaux démontrent que l'activation du TGF- β est principalement dépendante des lymphocytes T régulateurs (Trégs) qui expriment l'intégrine $\alpha\beta 8$. Par cette intégrine, les Trégs activent le TGF- β produit par les cellules cancéreuses et stocké sur la matrice extracellulaire de la tumeur. Cette activation entraîne une perte des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8 due à une augmentation du seuil d'activation du TCR en réponse aux complexes CMH-I/peptide. La signalisation du TGF- β favorise la forme inactive de LCK, protéine régulatrice de la signalisation du TCR, et donc la réponse des lymphocytes T CD8 contre les antigènes tumoraux de faible affinité. Ainsi, ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence une coopération inattendue entre les Trégs et les cellules cancéreuses, qui, via l'activation du TGF- β , influence l'amplitude de la réponse anti-tumorale des lymphocytes T CD8 contre les antigènes tumoraux.

Mots clés : lymphocytes T CD8, lymphocytes T régulateurs, TGF- β , itg $\alpha\beta 8$, TCR, affinité.

Summary

Solid tumors implement a large number of strategies to bypass the immune system and maintain themselves in the body. Among this arsenal, the cytokine Transforming Growth Factor beta (TGF- β) is considered to be one of the most powerful players, especially on CD8 T lymphocytes. This polypeptide, abundant in tumors, is secreted in an inactive form, without the ability to bind to its receptor. The objective of my thesis work was twofold: (i) to understand how TGF- β activation takes place in the tumor microenvironment and (ii) to understand the action of TGF- β on intra-tumoral CD8 T cells. Thus, our work demonstrates that TGF- β activation is primarily dependent on regulatory T cells (Tregs) that express the $\alpha\text{v}\beta 8$ integrin. Through this integrin, Tregs activate TGF- β produced by cancer cells and stored on the extracellular matrix of the tumor. This activation leads to a loss of cytotoxic functions of CD8 T cells due to an increase in the threshold for TCR activation in response to MHC-I/peptide complexes. TGF- β signaling promotes the inactive form of LCK, a regulatory protein of TCR signaling, and thus the CD8 T cell response against low affinity tumor antigens. Thus, this dissertation work revealed an unexpected cooperation between Tregs and cancer cells, which, via TGF- β activation, influences the magnitude of the anti-tumor response of CD8 T cells against tumor antigens.

Keywords : CD8 T cells, regulatory T cells, TGF- β , $\text{itg}\alpha\text{v}\beta 8$, TCR, affinity.

Laboratoire d'accueil

Equipe « TGF-beta et Réponse Immunitaire » Dirigée par le Dr Julien MARIE

CRCL- Cancer Research Center of LYON

UMR INSERM 1052 – CNRS 5286

Université Claude Bernard Lyon 1

Centre Léon Bérard – Cheney B

28 Rue Laënnec, 69373 Lyon Cedex 08

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement le **Docteur Nadège BERCOVICI** et le **Docteur Eric TARTOUR** d'avoir accepté d'évaluer mon travail et pour la lecture de mon manuscrit en qualité de rapporteurs. Je vous remercie également pour votre lecture attentive et vos retours sur mon manuscrit.

Je remercie également le **Docteur Claire HIVROZ**, la **Professeure Caroline MOYRET-LALLE** et le **Docteur Christophe CAUX** pour le fait d'avoir accepté d'être examinateurs de mon travail. Je tiens à remercier les membres de mon CST à savoir le **Docteur Christine MENETRIER-CAUX** et le **Docteur Romain RONCAGALLI** pour avoir assisté à l'ensemble de mes CSTs et de m'avoir donné des conseils.

Je tiens à remercier particulièrement **La Ligue Nationale Contre le Cancer** pour avoir financé mes quatre années de thèses.

Julien Marie, merci de m'avoir accepté au sein de ton équipe il y a maintenant quatre ans de ça, de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de travailler sur différents projets. Je te remercie également pour l'autonomie que tu m'as laissée au cours de ma thèse qui me permettra d'en faire une force pour la suite de ma carrière je l'espère. Merci également pour ces retraites d'équipe qui ont gravé de supers souvenirs, je n'oublierai jamais ta « macarena » et surtout tes talents de chanteur : Céline Dion n'a qu'à bien se tenir.

Saïdi Soudja merci pour ta présence au sein du labo. Tu es la personne la plus passionnée par la science que je connaisse, à tel point que tu en perds les mots, du moins dans ton cas ça serait à en rajouter 😊. Merci pour ta bienveillance, tes conseils d'un point de vue scientifique mais également sur un plan humain. J'ai pu partager ces quatre années de ma thèse avec toi que tu as rendu très sympathique. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite, une bonne continuation et que tu te développes comme tu le désires. Tous les week-ends/jours fériés passés avec toi vont me manquer. Je tiens à te rappeler qu'après Tenerife j'ai fini par soutenir 😊 ...

Je tiens à remercier mon trio de formatrice. **Sarah Renaud** merci encore de m'avoir ouvert la voie de l'immunologie lors de mon stage de M1, tu m'as permis de me faire la main sur mes premières techniques mais également sur la rigueur qu'il fallait pour poursuivre dans ma carrière. Je te souhaite beaucoup de bonnes choses pour la suite et également pour « ta petite Sarah (Iris) ». **Alexia Mopin** merci encore pour cette année incroyable que j'ai passée durant mon M2, tu m'as appris beaucoup de choses notamment la situation d'un doctorant en dernière année et le stress qui peut en découler. Je te souhaite beaucoup de bonnes choses pour la suite. Enfin comment faire une section remerciement sans te remercier comme il se doit **Alexandra Lainé**. Tu es la troisième du « jamais deux sans trois », tu m'as épaulé scientifiquement mais également humainement durant ton (trop) court séjour (selon moi) que l'on a partagé ensemble et tu continues d'être là pour me dispenser tes nombreux conseils. Merci pour tout ce que tu m'auras apporté : ta joie, ton « énervement » (« oui les LTs ne se centrifugent pas à 5000 RPMs c'est noté »), tes conseils culinaires mais également pour les différents ragots. Merci de m'avoir aidé dans le début de ma thèse et de m'avoir permis de partager ce projet de l'itgβ8. Humainement tu es une super personne et il n'y a rien à changer continue comme tu es, je te souhaite beaucoup de bonne chose à toi et la petite famille (Vincent et Léo). Merci encore Alexandra tu es au TOP.

Olivier Fesneau, la personne la plus sportive du laboratoire. A mon arrivée, tu m'as directement aidé et surtout donné des intestins et côlons en manip (ça, je n'oublie pas). Tu as

été formidable avec moi. Nos matinées de sport avant d'aller au laboratoire (du moins quand j'arrivais à me lever) m'ont énormément manqué après ton départ. Je suis vraiment content de t'avoir rencontré et partagé tes derniers moments au sein du labo.

Ramdane Igalouzene, une personne comme toi laisse vraiment une empreinte importante dans la vie des personnes qu'elle croise. C'est avec toi que j'ai passé la plus grande partie de ma thèse tu es vraiment une personne incroyable qui certes mange beaucoup de tacos mais qu'on aime quand même ^^ . De toute manière tu resteras le chef incontesté du clan dodu, j'espère que tous tes projets aboutiront ☺ (ps : si tu deviens millionnaire ne m'oublie pas, j'ai été le premier à commander chez NeoMed Scientific).

Elodie Guillemot, je tiens à te remercier pour ce que tu as pu faire pour moi, tu m'auras aidé dans l'avancement de mon projet quand bien même les boulettes que tu as faites (mélanger les cellules, ..., et j'en passe ☺). Sache que tu resteras incontestablement Elodie la flèche. Merci également pour ce que tu as apporté à l'équipe, tu as permis de mettre une bonne ambiance au sein du labo (même si on entendait que toi) sur le peu de temps que tu es restée ... Ton arrivée au laboratoire a été un des moments marquants de ma courte épopée au sein du laboratoire.

Hélène Tarayre un merci ne suffirait pas à te remercier correctement c'est pourquoi je te dis merci et mer.. (là c'est suffisant ☺) Merci pour ta présence au sein du laboratoire mais également de ta présence dans l'avancement de mon projet (notamment pour la cage miracle). Je te remercie pour toute l'implication que tu as pu fournir, ta sollicitude et ta bienveillance ^^ . Ces quelques mots ne sont malheureusement pas suffisant pour te remercier à ta juste valeur. Enfin ton arrivée au laboratoire a été un des moments marquants de ma courte épopée au sein du laboratoire.

Chloé Goldsmith, you are a ray of sunshine, you helped me a lot during your presence in the lab and after. It was a great pleasure to meet you. You always try to understand me with my TERRIBLE english. I missed your joy after you left the lab. I wish you the best and Chloé Guess What !?!? Ossama is leaving !

Valentin Thevin merci pour ta présence au sein du labo car sans toi je n'aurais jamais mangé autant de gâteaux du moins quand tu les fais dans les temps. Cette fois-ci c'est à mon tour de passer le flambeau, et je le fais même si sur l'échiquier tu te retrouves à droite. ps : Le Nord c'est en France ☺.

Sarah Bettini, nous sommes arrivés en même temps au sein de cette équipe sur des postes différents, tu étais un peu mon accompagnatrice de voyage par contre tu m'as quitté bien trop tôt. Malgré tout Merci pour l'année incroyable que tu nous as fait vivre avec à chaque fois une petite anecdote à la toulousaine et notamment celle de l'incroyable et fameux Raaaaaaoul (Olivier en est resté jaloux).

Stéphanie Rodriguez, merci d'avoir remis de l'ordre dans le chaos que tu as rencontré à ton arrivé. Tu as réussi à discipliner les plus indisciplinés de l'équipe « à vos ordres CapiChef ». Merci encore pour tout le travail que tu as fait notamment au niveau de l'animalerie et les PCRs qui, malgré un confinement, ont continué d'affluer.

Hector Vergas Hernandes, merci pour ton aide et tes conseils que tu auras pu me donner durant ma présence au sein de l'équipe. J'espère vite te revoir sur les routes de la bio-informatique.

Je tiens à remercier tout le petit groupe de stagiaires que j'ai eu la chance de croiser durant ma thèse notamment **Alexandre Guyennon** alias le papi qui aime faire des câlins. **Samya Aouad** merci pour ta présence, ta gentillesse et ta bonne humeur en permanence au sein du laboratoire (et aussi le cheese cake, d'ailleurs tu m'en dois toujours un). **Hani Ali Abid** pour sa

présence et sa non-motivation à faire du sport, par contre pour le Reyna d'ailleurs je n'oublie pas mais tu m'en dois un. **Shiqiang Xu** for you presence and your kindness, I wish you the best for your PhD. **Leo** et **Clara** pour nous avoir bien fait rire et notamment pour leur recette de poivre à l'œuf. **Ornella** pour ta gentillesse et ton humour (malgré toi). **Alexis** pour tes gâteaux, sache d'ailleurs que je suis toujours disponible s'il y a du rab. **Vivian** pour m'avoir pris mes anticorps, d'ailleurs il serait temps de penser à les rendre. **Oussema** pour avoir été toi. Et tous **les autres** que j'aurais pu oublier Merci.

Ghita Chabab merci pour ton côté ghita ^^je te souhaite bon courage pour la suite.

Je tiens à remercier l'équipe Gringberg :

Merci au chef de l'équipe, **Yenkel Gringberg-Blayer**, pour nos nombreuses discussions et tes conseils scientifiques mais également sur ma recherche de post-doc : promis j'ai compris New-York c'est la meilleure ville. Devine quoi d'ailleurs je prends 2 jours de vacances maintenant tu peux plus m'engueuler ^^.

Guilhem Lalle, tu es la personne de l'équipe Grinberg avec laquelle j'ai passé le plus de temps tu as été, malgré tes mauvais côtés qui sont bien trop long à dénombrer ici 😊, une personne géniale avec toujours le petit mot ou le petit dessin pour amuser la galerie, je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite et quand tu veux pour le match de badminton.

Allison Voisin alias le petit meuble de cette équipe, merci pour ta présence lors des soirées de manip. Tu as toujours été très gentille, malheureusement tu es parti bien trop vite. En tous les cas je te souhaite le meilleur pour la suite.

Raphaëlle Lautraite merci pour ces années passées à tes côtés dans NOTRE bureau (maintenant tu pourras dire que c'est le tien), tu as été une chouette coloc un peu tatillon sur la température ambiante, sur la lumière ... et j'en passe. Merci encore tu m'as rendu ces derniers moments de thèse plus supportables. Maintenant je te passe le flambeau et te souhaite de réussir en grande pompe. D'ailleurs n'oublie pas le 15 juin va être quelque chose de mémorable malheureusement je peux pas encore te le révéler.

Merci également au reste de cette équipe notamment **Pierre Stephan** pour avoir toujours le dernier mot permettant de faire rire, mais également pour les sorties bubble foot ou karting grâce à toi j'ai eu un peu de concurrence. Merci également à **Julie**, **Maud** pour avoir perdu un grand nombre de pari et avoir fait des bons petits gâteaux du moins des petits gâteaux 😊, **Khaled** heureusement que ce n'est pas toi qui est parti sur la lune car sinon jamais l'Homme n'aurait pu faire un pas, vu que tu ne te déplaces qu'en voiture ^^, **Insaf** pour ta gentillesse et ces quelques soirées au labo maintenant tu pourras être la dernière à partir, **Marlène** (la plus gentille de tout le labo), d'avoir partagé des moments de ma vie au labo que ce soit dans des activités en dehors de ce dernier ou lors des repas et autres.

Merci à la team Caux, notamment Candice, Valentin, Antoine et tous les autres avec qui j'aurais pu partager quelque chose.

Manuela Pereira Abrantes je tiens à te remercier particulièrement, pour toutes nos discussions que nous avons pu avoir qui m'ont permis de me sentir mieux et d'avancer. Tu es une personne en or. Je te souhaite vraiment beaucoup de bonnes choses parce que tu le mérites et que tu es une personne forte. J'espère que tout se passera bien pour la fin de ta thèse même si je n'en doute pas et si tu as besoin « hésite pas ^^ ». Merci encore pour ce que tu auras pu faire pour moi.

Un grand merci à notre super gestionnaire **Mounia**, pour le temps des pauses cafés mais également pour m'avoir aidé dans l'administratif (avec les ordres de missions etc...) Merci encore.

Merci aux personnes de la plateforme P-PAC : **Manon** pour m'avoir fait ma formation de nouvel entrant et d'avoir tout le temps été gentille. **Blandine, Maxime, Clarisse, Dédé** et **Judith** pour vous être occupés de mes animaux et pour votre gentillesse. Merci également aux souris ITGβ8 WT et KO mais également aux souris F5 WT, RCA et KO et les autres parce que sans elles aucune manip n'aurait été possible).

Je tiens également à remercier les membres de la plateforme de Cytométrie **Priscilla** pour ta bonne humeur et ta gentillesse, **Agathe** pour ta bonne humeur de bon matin après mes nocturnes et enfin **Thibault** pour les conseils et les discussions intéressantes que l'on a pu avoir. Merci au Facs Aria surnommé de tous « **Spark** » avec qui j'ai partagé de longs moments durant ma thèse.

Merci également à **Christophe Vanbelle**, pour son aide sur les différents aspects de la microscopie mais pas que, merci également pour ta bonne humeur et ta gentillesse légendaire.

Je tiens également à remercier mes amis, **Samy Jambon** pour avoir partagé des moments au FACS avec moi malgré les 9h de décalage horaire qui nous séparent. Merci également pour tes conseils et toute la bienfaisance à mon égard que tu m'apportes. Merci à toi **Gautier Lazardeux** pour ces petits moments passés au téléphone ou lors de mon passage sur Lille. Maintenant je te souhaite bien du courage dans la rédaction de ta thèse de médecine. Merci également à mes amis tels que Julien, Amine, Charles, Nicolas ou encore Eric et également Pierre qui m'ont permis de grandir et de me forger au fil de mon développement.

Merci également au reste des personnes que je n'aurais pas citées ici par oubli ou manque de place mais qui ont contribué de près ou de loin au développement de la personne que je suis. Merci à vous

Enfin pour finir je tiens à remercier mes chers parents. **Maman, Papa** je tiens particulièrement à vous remercier (même si c'est quelques mots ne suffiront jamais à vous remercier à votre juste valeur) pour votre présence au quotidien, l'éducation que vous m'avez donnée mais également la confiance, qui ont permis de faire de moi l'homme que je suis aujourd'hui. Je remercie également mes **deux frères** avec qui j'ai partagé beaucoup de bonnes choses.

Liste des abréviations

ADP : adénosine diphosphate	IL-2 : interleukin 2
AIRE : auto-immune regulator	iNKT : invariant natural killer T
ATF-1 : activating transcription factor 1	iNOS : inducible isoforme nitric oxide synthases
ATP : adénosine triphosphate	ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif
BCL-2 : B-cell lymphoma 2	ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
BCL-XL : B-cell lymphoma-extra large	ITSM : immunoreceptor tyrosine-based switch motif
BID : BH3 interacting-domain death agonist	Jab1 : c-Jun activation domain-binding protein-1
BIM : Bcl-2 interacting mediator of cell death	JAK : janus kinase
BLIMP1 : b lymphocyte-induced maturation protein-1	JNK1/2 : C-Jun N-terminal kinase
BTLA : B and T lymphocyte attenuator	LAG3 : lymphocyte activation gene3
CCL : chemokine (C-C motif) ligand	LAP : latency-associated peptide
CCR7 : C-C chemokine receptor type 7	LAT : linker activation of T cells
CDR : complementary determining region	LB : lymphocyte B
CLP : common lymphoid precursor	LCK : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	LFA1 : lymphocyte function-associated antigen 1
CMP : common myeloid precursor	LLC : large latency complex
COX2 : cyclooxygenase-2	LT : lymphocyte T
CPA : cellule présentatrice d'antigène	LTBP : latent TGF- β binding protein
cSMAC : central supra molecular activation cluster	LRRC33 : leucine-rich-repeat-containing protein 33
CSK : C-terminal Src kinase	M6pR : manose-6-Phosphate Receptor
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	MAPK : mitogen-activated protein kinases
cTEC : cortex thymic epithelial cells	MCSF : macrophage colony stimulating factor
CXCL12 : C-X-C motif chemokine ligand 12	MDSCs : myeloid derived suppressor cells
DAG : diacylglycerol	MET : microenvironnement tumoral
DAMPs : damage associated molecular pattern	mTEC : medullary thymic epithelial cell
DC : dendritic cell	NFAT : nuclear factor of activated T cells
DISC : death-inducing signaling complex	NFκB : nuclear factor κ B
DGK-ζ : Diacylglycerol kinase zeta	NHEJ : non-homologous end-joining
DP : double positif	NK : natural killer
DN : double négatif	NSCLC : non small cell lung cancer
DUSP22 : dual specificity protein phosphatase 22	NRROS : negative regulator of reactive oxygen species
DST : dystonin	Pax5 : paired box 5
DTR : diphtheria toxin receptor	PD-1 : programmed cell death 1
EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis	PD-L1 ou 2 : programmed cell death ligand 1 ou 2
EBF : early b cell factor	Pdcd1 : programmed cell death protein 1
ERAD : endoplasmic reticulum-associated protein complex	Pi3K : phosphatidylinositol 3 kinases
ERGIC : endoplasmic reticulum golgi intermediate compartment	PKCθ : protein kinase C θ
ERK : extracellular signal-regulated kinases	PLC : peptide loading complex
ErP57 : endoplasmic reticulum-resident protein 57	PLCγ : phospholipase C γ
Fezf2 : fez family zinc finger 2	PMA : phorbol myristate acetate
FKBP12 : FK506 binding protein 12	PP1c : protein phosphatase 1
FN14 (TWEAKR receptor) : tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis receptor	PTPN2 ou 22 : protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 ou 22
Foxo1 : forkhead box o1	RAG : recombination activating gene
FoxP3 : forkhead box protein-3	RE : réticulum endoplasmique
Fyn : member of the Src family	RGD : arginyl-glycyl-aspartic acid
GADD34 : growth arrest and DNA damage-inducible protein	RIPK1 : receptor-interacting serine/threonine protein kinase 1
GARP : glycoprotein A repetition predominant protein	Roc1 : RING finger protein
GITR : glucocorticoid-induced TNFR family related gene	RORγT : retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor γ
Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2	ROS : reactive oxygen species
GzB : granzyme B	RSS : recombination sequence signal
HMGB1 : high mobility group box 1 domain	SCF : Skp, Cullin, F-box containing complex
ICAM-1 : intracellular adhesion molecule-1	SHP1 : src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
ICOS-L : inducible t cell costimulator ligand	SI : système immunitaire
IDO : indoléamine 2,3 dio oxygenase	SLC : small latent complex
IFNAR : interferon α/β receptor	SLP76 : SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa
IFN : interferon	

SMAD : Sma- (small mutants) and MAD (Mothers against decapentaplegic)
SMURF2 : SMAD specific Ubiquitin protein ligase 2
SP : simple positif
STAT : signal transducer and activator of transcription
TAP : transporter associated protein
T-bet : t box expressed in t cells
TCR : t cell receptor
Tfh : T follicular helper
Th : T helper
TGF- β : Transforming growth factor beta
TGF- β RI ou RII: récepteur I ou II au TGF- β
Tim-3 : T-cell immunoglobulin and mucin domain-3
TNF- α : tumor necrosis factor α

TNFR : tumor necrosis factor receptor
TNFRSF9 (4-1BB) : tumor necrosis factor receptor superfamily member 9
TNFRSF9L (4-1BBL) : tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 ligand
TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2
TRIM33 : tripartite motif containing 33
TSAd : T specific adaptators
TSP-1 : thrombospondin 1
TWEAK : tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1
VEGF : vascular endothelial growth factor
ZAP70 : zeta-chain-associated protein kinase 70

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la mise en place des chaînes du TCR (chaîne α)

Figure 2 : Développement thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$

Figure 3 : Signaux nécessaires à l'activation du lymphocyte T

Figure 4 : Représentation schématique des CMH-I/II

Figure 5 : Mécanismes de présentation croisée de l'antigène par le CMH-I

Figure 6 : Interaction entre LCK et le TCR

Figure 7 : Régulation de l'activité de LCK

Figure 8 : Signalisation induite après l'engagement du TCR

Figure 9 : Représentation schématique de la synapse immunologique

Figure 10 : L'immuno-édition

Figure 11 : Les caractéristiques du cancer

Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes suppresseurs de la réponse immunitaire induits par le lymphocyte T régulateur

Figure 13 : Synthèse et sécrétion du TGF- β

Figure 14 : Activation du TGF- β inactif

Figure 15 : La signalisation du TGF- β

Figure 16 : Effet du TGF- β sur la réponse immunitaire

Figure 17 : Schéma récapitulatif des objectifs principaux de la thèse

Figure 18 : Schéma de conclusion

Figure 19 : Analyse heat-map montrant l'expression différentielle de certains gènes entre des LTrégs $itg\beta 8^{pos}$ et LTrégs $itg\beta 8^{neg}$

Figure 20 : Volcano plot des données RNA-seq provenant de LTs F5 TGF- β RII^{KO} vs LT F5 TGF- β RII^{WT} naïfs

Liste des tableaux

Tableau 1 : Thérapies en essais clinique contre le TGF- β dans le cancer basé sur les oligonucléotides antisens

Tableau 2 : Thérapies en essais clinique contre le TGF- β dans le cancer basé sur les inhibiteurs d'intégrines

Tableau 3 : Thérapies en essais clinique contre le TGF- β dans le cancer basé sur l'interaction entre le ligand et le récepteur

Tableau 4 : Thérapies en essais clinique contre le TGF- β dans le cancer basé sur des inhibiteurs de kinase

Tableau 5 : Thérapies en essais clinique dans le cancer par la délétion du récepteur au TGF- β dans des CAR-T

INTRODUCTION

L'implication du système immunitaire dans le contrôle de la croissance tumorale n'est plus à démontrer. L'efficacité des traitements visant à utiliser notre système de défense et plus particulièrement les lymphocytes T effecteurs ont révolutionné la prise en charge des patients atteints de cancers au cours des dix dernières années. Cependant, les immunothérapies actuelles ne fonctionnent que chez 10 à 30 % des patients. Basées sur la levée de verrous de l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques, dont notamment l'action répressive de PD-1/PD-L1, il apparaît clairement que d'autres mécanismes régulateurs mis en place par la cellule cancéreuse ou son micro-environnement contribuent à bloquer l'action de ces lymphocytes T effecteurs dans la lutte contre les cellules cancéreuses.

Au cours de cette introduction, je me focaliserai principalement sur les lymphocytes T CD8, acteurs majeurs du système immunitaire dans la réponse anti-cancer. Dans un premier temps, je me concentrerai sur le développement des lymphocytes T en partant du progéniteur commun lymphoïde jusqu'au T naïf. Dans un second temps, j'éclaircirai les effets du TGF- β sur le système immunitaire en me focalisant tout d'abord sur la cytokine TGF- β en elle-même puis j'aborderai son impact sur les lymphocytes T.

I- Les lymphocytes T

1) Ontogénie des lymphocytes T

Chez les mammifères, le développement des lymphocytes T est mis en place avant la naissance. A partir de précurseurs situés au niveau du foie, les lymphocytes T CD4 et CD8 se développent dans le thymus dès la vie fœtale aux environs de la 12-15^{ème} semaine chez l'Homme et du 10-13^{ème} jour chez la souris. En fin de vie fœtale et pour le reste de la vie de l'individu, les cellules initiatrices des lymphocytes T seront d'origine médullaire. Les précurseurs gagnent le thymus, organe multilobé au niveau de la cage thoracique et au voisinage du cœur, où s'opèrent la différenciation, la sélection et la maturation des cellules lymphocytes T. Les cellules ayant passé ces étapes gagneront ensuite la périphérie pour composer le pool de lymphocytes T circulants et résidants dans les tissus.

A Précurseurs lymphoïdes

Au niveau du foie et de la moelle osseuse, les précurseurs lymphoïdes dérivent de cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules sont caractérisées par un auto-renouvellement, une prolifération importante ainsi qu'un potentiel de différenciation accru (Murre 2009). Une fraction de ces cellules va se différencier en perdant alors leur capacité d'auto-renouvellement et en donnant naissance aux progéniteurs multipotents qui se différencient à leur tour en progéniteurs communs myéloïdes (CMPs) et progéniteurs communs lymphoïdes (CLPs). Les CLPs expriment notamment Lin-Flk2⁺CD127⁺CD27⁺ chez la souris et Lin-CD34⁺CD38⁺CD10⁺ chez l'Homme. Les CLPs exprimant CCR7 et CCR9 (Krueger et al. 2010; Zlotoff et al. 2010) se dirigent vers le thymus via la circulation sanguine en suivant le gradient des chimiokines CCL19, CCL21 et de CCL25 produites en grande quantité au sein de l'organe de maturation des lymphocytes T. Les cellules thymiques vont retenir les CLPs via l'expression de sélectines qui reconnaissent PSGL-1 exprimé par les CLPs comme le démontre l'invalidation de PSGL-1 et le défaut de recrutement des CLPs au niveau du thymus associé (Xia et al. 2002). En réponse à CCL25, les CLPs expriment les intégrines α L β 2 et α 4 β 1 qui reconnaissent les molécules ICAM-1 et VCAM-1, engageant l'entrée des CLPs au niveau de la jonction cortico-médullaire du thymus via diapédèse.

B PréT

L'entrée des CLPs au niveau de la jonction cortico-médullaire, appelés maintenant thymocytes, est suivie de nombreux événements de différenciations et de maturations menant au développement des lymphocytes T matures.

Les thymocytes vont alors subir plusieurs stades de différenciation : le stade double négatif (DN) subdivisé de DN1 à DN4, le stade double positif (DP) et le stade simple positif (SP). Le stade DN se réalise dans le cortex et se distingue principalement par l'expression de marqueurs présents au niveau de la membrane cellulaire. Au stade DN1 CD44⁺ CD25⁻ (Porritt et al. 2004), les cellules gardent encore un grand potentiel de différenciation et peuvent donner naissance à plusieurs types cellulaires dont les lymphocytes T, mais aussi des

lymphocytes B via la perte d'expression de Notch 1. Notch 1 est d'une extrême importance dans le développement des LTs comme il a pu être montré par Wilson et ses collaborateurs car des CLPs déficients en Notch 1 adoptent un état de LB au niveau du thymus (Wilson, Macdonald, et Radtke 2001). En effet, il a pu être montré que la signalisation induite par Notch déstabilise l'activité de E2A ainsi que les facteurs de transcription impliqués dans le développement des LB qui sont EBF et Pax5 (L. Nie et al. 2003; Taghon et al. 2005), des NKs (via l'expression de facteurs de transcription tels que ID2 ou ID3, ces facteurs ainsi exprimés favorisent la différenciation en NK) ainsi qu'à certaines cellules dendritiques (DCs). La voie de signalisation de Notch 1 est largement induite chez les thymocytes par la forte expression de son ligand Delta1 porté par les cellules thymiques corticales. Cette voie de signalisation Notch 1 s'avère essentielle pour la différenciation en DN2 (Jaleco et al. 2001; von Boehmer 2005) car les souris dont les précurseurs lymphoïdes précoces sont déficients en Notch 1 ne possèdent pas de cellules pré-T (Wilson, Macdonald, et Radtke 2001). A ce stade, les thymocytes perdent leur capacité à se différencier en lymphocytes B et expriment CD25 et CD44 (T. M. Schmitt et al. 2004). Un autre facteur important pour cette différenciation est la présence d'IL-7 permettant l'expansion et la survie des thymocytes. Des études menées par Peschon et collaborateurs ainsi que Von Freeden et collaborateurs ont montré que des souris dépourvues de production d'IL-7 ou de récepteurs à l'IL-7 (CD127) avaient une réduction importante du nombre voire une absence des lymphocytes T (Von Freeden-jeffry et al. 1995; Peschon et al. 1994). Les thymocytes DN2 migrent vers le cortex interne en maintenant un pouvoir de différenciation en lymphocytes NK, en cellules dendritiques et en lymphocytes T. Au signal donné via la voie Notch 1 et l'IL-7R, l'expression des enzymes RAG1 et RAG2 permet la formation du récepteur des lymphocytes T, le TCR. Le stade DN3 (CD44⁺ CD25⁺) donne lieu au réarrangement des chaînes du TCR δ et γ d'un côté et de la chaîne β de l'autre (Capone, Hockett, et Zlotnik 1998). Ce réarrangement des chaînes du TCR sera détaillé plus précisément dans le paragraphe suivant, cependant les lymphocytes T $\gamma\delta$ ne faisant pas partie de l'axe étudié ils ne seront pas détaillés. Les thymocytes au stade DN3 perdent alors leur capacité à se différencier en cellules dendritiques ou encore en lymphocytes NK et s'engagent dans le lignage T. Ils vont alors migrer vers le cortex externe où une fraction se différenciera en lymphocytes T $\gamma\delta$ si le réarrangement précoce des chaînes δ et γ est terminé avant la mise en place de la chaîne β . Cette population représente environ 5% des LTs totaux chez l'adulte et est retrouvée principalement au niveau des zones de contact air/muqueuse. Dans le cas où la

chaîne β est mise en place avant le TCR $\gamma\delta$, elle s'associe à une chaîne α invariante $pT\alpha$, les deux chaînes constituant le pré-TCR. Ce pré-TCR est associé avec les chaînes invariantes γ , δ , ϵ et σ de la molécule CD3 pour composer le complexe pré-TCR qui est exporté à la membrane. Une étape dite de sélection bêta (β -sélection) est alors mise en place. Les cellules corticales thymiques vont envoyer un signal faible au complexe pré-TCR $\alpha\beta$ dû à la reconnaissance du complexe CMH-peptide par la chaîne β du pré-TCR via les CDRs (régions déterminant de la complémentarité) de cette dernière (Mallis et al. 2015). Il a également pu être montré par les travaux de Hayes que la différenciation des LTs $\alpha\beta$ peut être due à des LTs $\gamma\delta$ qui ont reçu un faible signal (en effet pour le développement des T $\gamma\delta$, un signal fort est nécessaire ainsi, en l'absence de ce signal fort, les LTs $\gamma\delta$ retournent dans le lignage $\alpha\beta$) (Hayes, Li, et Love 2005; Hayes, Laird, et Love 2010). Le signal induit au niveau du pré-TCR $\alpha\beta$ est important pour la prolifération et la différenciation au stade suivant. La signalisation induite par le pré-TCR en réponse au complexe CMH-peptide va entraîner un maintien de l'expression de CD127 (IL-7R) et permettre l'expression du gène anti-apoptotique *bcl2a1* qui code pour la protéine A1 qui inhibe la caspase 3 et bloque l'apoptose (Mandal et al. 2005). Cependant il existe également un modèle selon lequel le pré-TCR serait capable de délivrer le signal nécessaire de manière autonome grâce à l'oligomérisation de la chaîne α du pré-TCR et ainsi poursuivre le développement du LT comme il a pu être rapporté par l'étude de Yamasaki (Yamasaki et al. 2006). Le stade DN4 CD44⁻ CD25⁻ est caractérisé par la perte d'expression de molécules de surface et la mise en place de la chaîne α du TCR via un réarrangement de l'ADN constituant ainsi un TCR complet et un complexe TCR mature. Les thymocytes expriment alors les molécules CD4 et CD8 qui reconnaissent les molécules de CMH-I et CMH-II. A ce stade DP (double positif), les cellules sont capables de reconnaître un peptide présenté par le CMH-I ou le CMH-II, selon le type de CMH reconnu, la différenciation en CD4 ou CD8 va être privilégiée (Hernández-Munain, Sleckman, et Krangel 1999).

C Réarrangement du TCR → protéines RAG

L'assemblage du TCR est initié durant le stade DN2 et fait intervenir deux protéines majeures, RAG 1 et RAG 2 (recombination activating gene), qui permettent la recombinaison de l'ADN.

Le TCR des lymphocytes T conventionnels est composé de deux chaînes : la chaîne α et la chaîne β . L'ADN codant pour ces structures est composé de segments variables (V) et de jonction (J) pour la chaîne α et des segments variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) pour la chaîne β . Le complexe RAG1/RAG2 se fixe sur l'ADN et coupe au niveau des séquences de signaux de recombinaison (RSS) qui précèdent et suivent chacune des différentes régions V(D) et J. Les séquences RSS sont des séquences spécifiques composées d'un heptamère conservé suivi d'une séquence intercalante de 12 ou 23 nucléotides et enfin un nonamère conservé qui flanque les loci des gènes V (D) et J. Ces coupures induisent des dommages à l'ADN qui sont réparés grâce au mécanisme de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). Un locus avec une RSS dont la séquence intercalante est de 12 nucléotides se recombine avec un autre locus dont la RSS est une séquence de 23 nucléotides (Steen, Gomelsky, et Roth 1996). La protéine RAG 1 reconnaît la séquence RSS et la protéine RAG 2 favorise la fixation de RAG1 au niveau de l'heptamère et le clivage de l'ADN (Figure 1) (Fugmann, Schatz, et Haven 2001).

La recombinaison V (D) J est finement régulée à plusieurs niveaux, notamment les protéines RAG vont être très exprimées uniquement durant les stades précoces du développement du lymphocyte (thymocytes DN2-DN3) (Yancopoulos G.D cell 2008). Une coopération entre l'enhancer E β , qui agit comme élément contrôlant l'accessibilité à la chromatine, et les promoteurs pD β 1 ou pD β 2 occasionne le recrutement d'un complexe protéique SWI-SNF qui permet le remodelage de la chromatine et rend ainsi les séquences RSS accessibles par le complexe RAG pour la recombinaison des loci (Osipovich et al. 2007). La chaîne β du TCR, mise en place en premier durant le développement du lymphocyte T, commence par la recombinaison entre le locus D et le locus J puis entre le locus V et le locus DJ. Comme il existe deux segments D, D β 1 et D β 2, la première recombinaison s'effectue respectivement soit avec l'un des 6 segments de J β 1, soit avec l'un des 6 segments de J β 2. Lors de la seconde recombinaison, l'un des 30 segments V β différents (connus à ce jour) se recombine au DJ déjà assemblé expliquant ainsi la grande diversité du répertoire TCR. Après cette étape, la région constante est ajoutée soit la C β 1 soit C β 2 selon le même motif que précédemment. Le réarrangement de la chaîne α du TCR, se produisant dans un second temps, ne comporte qu'une recombinaison entre le locus V et le locus J. La chaîne α et δ du TCR partage le même locus V dénombrant 100 segments différents dont 46 associés à la chaîne α . Le locus J, lui, est spécifique à chaque chaîne et compte 61 segments possibles pour la chaîne α et une seule

région constante est disponible (Figure 1). Ces réarrangements engendrent de très nombreux lymphocytes aux TCR différents et spécifiques. Le nombre de combinaisons possibles est estimé à 10^{18} soit autant d'antigènes possibles pouvant être reconnus par les lymphocytes T. Chacune des chaînes α et β dispose de 3 régions appelées les CDR (complementary determining region). Ces régions vont être en contact avec le complexe CMH-peptide présenté par les cellules thymiques puis périphériques. Les régions CDR1 et CDR2 vont être en contact des bords du sillon du CMH, tandis que la région CDR3 interagit avec le peptide.

Ainsi, une grande variété de lymphocytes T avec des TCR différents couvrant une reconnaissance d'un large spectre de complexe CMH-antigènes est mise en place et parmi eux des LTs capables de reconnaître des antigènes portés par des cellules cancéreuses.

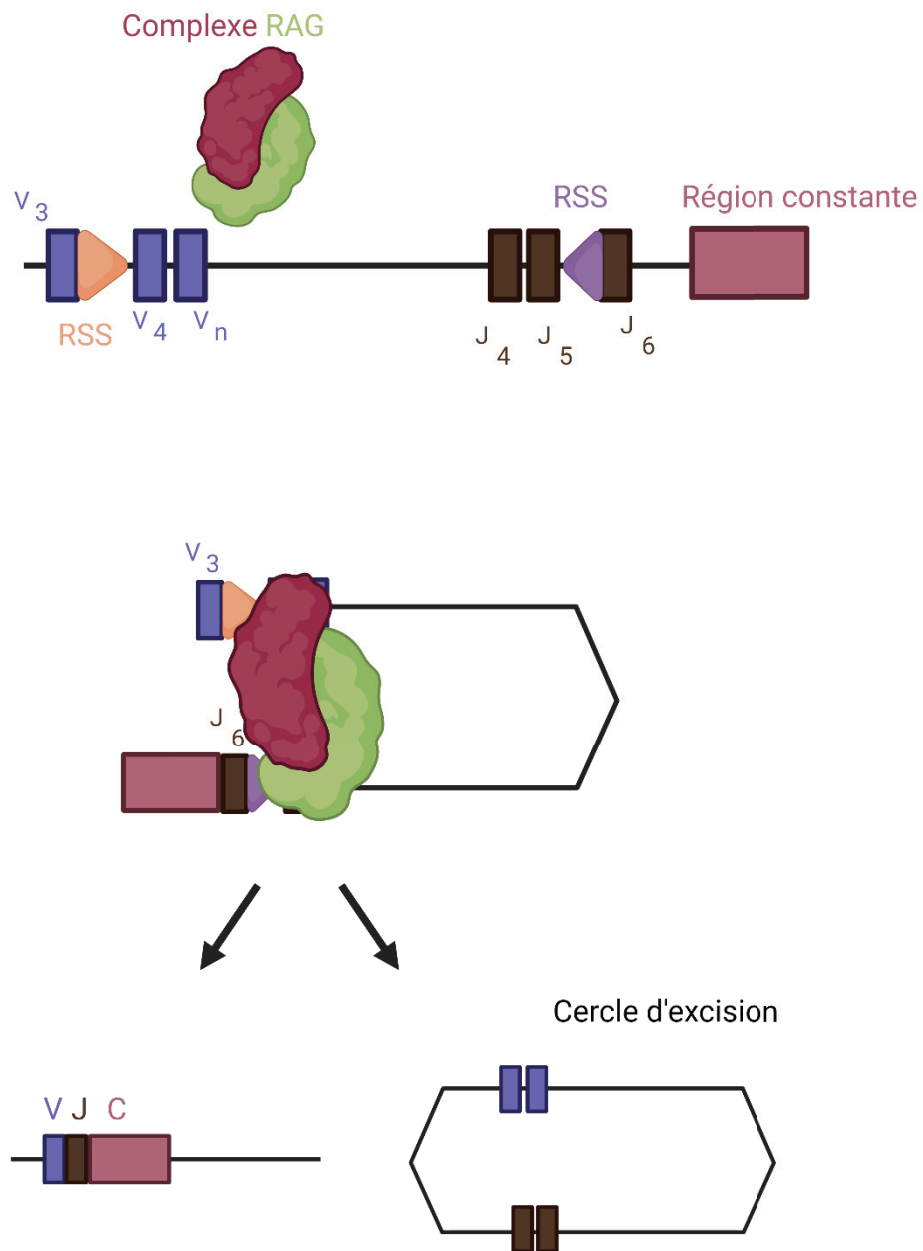


Figure 1 : Représentation schématique de la mise en place des chaînes du TCR (chaîne α). Les séquences signal de recombinaison (RSS) flanquant les loci des gènes V, D, J. Ici V et J sont reconnues et rapprochées par un groupe d'enzymes pour permettre la recombinaison. Le complexe RAG clive l'un des deux brins d'ADN au niveau des séquences RSS conduisant à la formation d'une épingle à cheveux. Les extrémités clivées des RSS se joignent formées d'un côté de la séquence VJ codante et de l'autre d'un cercle d'excision qui sera éliminé. Les séquences VJ dans le cas de la chaîne α et VDJ dans le cas de la chaîne β permettent de mettre

en place les récepteurs des cellules T : le TCR (dans le cas de la génération du BCR, le principe du réarrangement reste similaire).

Les petits rectangles représentent les segments codant pour les régions V et J, le grand rectangle la région constante et les triangles les séquences signal de recombinaison (RSS).

D Sélection et maturation dans le thymus

Au stade DP, les thymocytes situés au niveau du cortex vont subir une sélection durant laquelle une grande majorité va mourir par apoptose. Cette sélection implique l'interaction du TCR avec le complexe CMH-peptide des cTECs (cellules corticales épithéliales thymiques). Les thymocytes incapables de reconnaître les molécules CMH présentées par les cTECs sont éliminés. Ce phénomène de sélection positive est couplé dans le cortex à celui de la sélection négative corticale. Si l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide est modérée, le thymocyte sera gardé. Au contraire, si l'affinité est trop forte, il sera éliminé également par apoptose. Le signal TCR reçu passe par l'axe de signalisation LCK-ZAP70. La stimulation du TCR permet la phosphorylation de LCK (protéine tyrosine kinase spécifique des lymphocytes) qui phosphoryle ZAP70 (protéine kinase 70 associée à la chaîne zêta) qui lui-même phosphoryle LAT (linker pour l'activation des lymphocytes T) permettant l'activation de la voie MAPK. Dans le cas d'une faible affinité mais suffisamment forte, seule la voie Erk1/2 va être engagée conduisant à la survie des thymocytes avec notamment l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xl. Dans le cas d'une forte affinité, les voies Erk1/2 mais également JNK1/2 et P38 seront mises en place entraînant l'expression des protéines pro-apoptotiques telles que Bim (Bouillet et al. 2002; Gray et al. 2012). L'étape de la sélection corticale est concomitante avec la perte de soit CD4 soit CD8 et donc liée à la capacité du futur lymphocyte à reconnaître les molécules de CMH-II ou CMH-I respectivement.

Les thymocytes SP sélectionnés vont réexprimer CCR7 et se localiser au niveau de la médulla qui exprime CCL19 et CCL21, les ligands de CCR7. Dans ce compartiment thymique, les cellules mTECs (cellules médullaires épithéliales thymiques) expriment les protéines AIRE et Fezf2, deux facteurs de transcription, pour permettre l'expression d'un large éventail de gènes spécifiques à n'importe quel tissu de l'espèce de l'individu sans restriction de sexe et du stade

embryonnaire à l'adulte. Des souris délétées pour le gène exprimant la protéine AIRE développent une forme d'auto-immunité (Yano et al. 2008) mais pas aussi drastique qu'attendue. En effet, si la sélection négative médullaire élimine une grande partie des lymphocytes dont le TCR présente une grande affinité pour des antigènes tissulaires, les travaux du groupe de Kristin A Hogquist démontrent clairement que la sélection négative corticale élimine plus de 90% des lymphocytes T auto-réactifs (Klein et al. 2014). Les thymocytes n'ayant pas reçu de signal ou un signal très faible au niveau de la médulla poursuivent leur maturation afin de devenir des lymphocytes T CD4 naïfs et T CD8 naïfs. Ceci à l'exception de la maturation des lymphocytes dits T régulateurs. En effet, ce type de LTs nécessite pour leur développement un signal fort obtenu lors de la reconnaissance TCR et complexe CMH-peptide, comme il a pu être montré par le groupe de Cozzo Picca, en utilisant des souris ayant des TCR d'affinités croissantes pour le peptide de l'hémagglutine où seuls les TCRs de forte affinité pour l'antigène permettent le développement des LTrégs (Picca et al. 2011). Après la sélection médullaire, les thymocytes gagnent la jonction cortico-médullaire pour rejoindre la circulation sanguine et se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires pour potentiellement rencontrer une cellule présentatrice d'antigène portant l'antigène spécifique du TCR.

A la fin de ce processus complexe de tolérance centrale, le répertoire des lymphocytes T périphériques est amputé d'un grand nombre de cellules auto-réactives contre les antigènes du soi mais une fraction de cellules T auto-réactives demeure. En effet, la reconstitution d'un compartiment T de souris RAG1 ou RAG2 KO en l'absence de cellules LTrégs conduit à une forte réaction auto-immune confirmant que la purge en cellules lymphocytes T périphériques n'est pas totale. De plus, chez la souris Scurfy, dont le gène *foxp3* est muté impliquant un défaut de génération des LTrégs, il est observé une forme d'auto-immunité (Hadaschik et al. 2015). Cette observation est essentielle dans la lutte contre le cancer via les lymphocytes T puisqu'il est admis qu'un grand nombre d'antigènes tumoraux sont des antigènes du soi. Ainsi, des mécanismes de relais en périphérie assurent une tolérance contre les antigènes du soi et donc jouent un rôle majeur dans le contrôle de la réponse anti-tumorale.

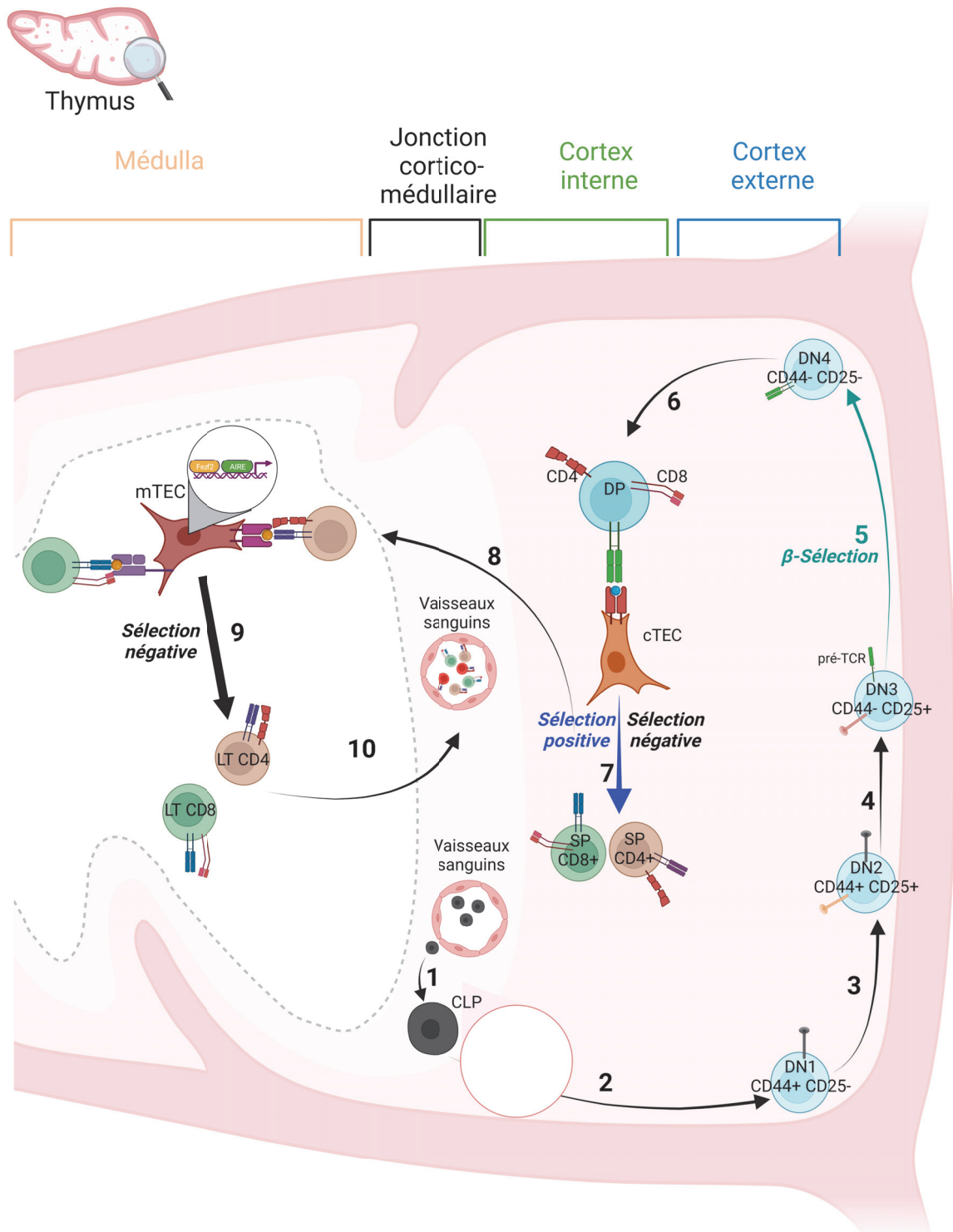


Figure 2 : Développement thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$.

Le développement lymphocytaire va avoir lieu au sein d'un lobule thymique. 1) Entrée du CLP via les vaisseaux sanguins. 2 à 4) Différenciation des leucocytes DN sous le contrôle de différents facteurs de leur environnement. 5) Etape de la β -sélection. 6) Passage au stade DP. 7) Etape de sélections positive et négative corticales entraînant l'émergence des SP CD4/CD8.

8) Migration des SPs vers la zone médullaire pour rencontrer les mTECs. 9) Etape de sélection négative médullaire pour la génération du pool des LTs CD4/CD8. 10) Migration des LTs naïfs générés vers la jonction médullaire pour rejoindre la périphérie.

CLP : progéniteur lymphoïde commun, cTECs : cellules épithéliales thymiques corticales, DN : double négatif ($CD4^- CD8^-$), DP : double positif ($CD4^+ CD8^+$), SP : simple positif, mTECs : cellules épithéliales thymiques médullaires, AIRE : régulateur auto-immunitaire, LT : lymphocyte T.

2) Activation des LTs

Suite à la mise en place du LT naïf au niveau du thymus, ce dernier entre dans la circulation et migre vers les organes lymphoïdes secondaires. Ces LTs naïfs gardent une grande capacité de migration entre les différents organes lymphoïdes secondaires tant qu'ils n'ont pas rencontré de complexe CMH-peptide ayant une affinité suffisante pour leur TCR et ainsi induire leur activation.

A La reconnaissance antigénique

i Organes lymphoïdes secondaires

L'initiation de la réponse T a lieu au niveau des organes lymphoïdes secondaires qui comprennent la rate, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyers restreintes à l'intestin grêle. Le ganglion est une structure globuleuse divisée en plusieurs espaces, la zone corticale riche en lymphocytes B, la zone paracorticale riche en LTs et les sinus ou cordons médullaires qui sont une zone riche en macrophages et un lieu de capture des antigènes portés par la lymphe. La rate est composée de deux sortes de tissus : la pulpe rouge, qui est composée de sinusoides veineux contenant les érythrocytes, et la pulpe blanche, constituée de tissus lymphoïdes avec une zone T (entourant les artérioles) et une zone B (organisée en follicules). Les plaques de Peyers, composées d'agrégats de 5 à 200 follicules lymphoïdes, sont retrouvées à intervalles réguliers dans l'iléon au niveau de la partie terminale. Les lymphocytes T $CD8^+$ qui n'ont rencontré aucun complexe CMH-peptide en périphérie sont dits naïfs. Ils rentrent dans les ganglions via les vaisseaux lymphatiques afférents et dans la rate via le réseau sanguin. Ils se positionnent au niveau de la zone paracorticale pour les ganglions

et de la zone T pour la rate. Les organes lymphoïdes secondaires sont aussi le lieu de migration des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques qui migrent vers l'organe lymphoïde le plus proche après avoir capté des antigènes de cellules et mûri en réponse aux signaux de danger ou de stress perçus au site de capture de l'antigène. Les DCs se positionnent au niveau des zones T où ils établissent des contacts physiques et multiples avec les lymphocytes T naïfs

ii Cellules présentatrices d'antigènes

Si les macrophages présentent une activité de cellules présentatrices d'antigènes au lymphocyte T naïf, les cellules dendritiques sont de loin les professionnelles de cette fonctionnalité. Sentinelles dans les tissus, elles sont sensibles aux signaux de stress ou de danger du micro-environnement tumoral. Bien que dans le corps un grand nombre de cellules meurent chaque jour par apoptose, il est essentiel que cette dernière n'induit pas de réponse immunitaire, cela relève de l'apoptose dite « physiologique ». Un des facteurs limitants dans les traitements anti-cancéreux est le fait que la mort cellulaire induite passe souvent par la voie de l'apoptose physiologique entraînant ainsi une tolérance aux antigènes cancéreux. Cependant certaines cellules cancéreuses meurent par apoptose (de manière naturelle ou suite à l'induction via radiothérapies ou encore thérapies photodynamiques (Dudek et al. 2013)) avec la présence de signaux de danger tels que les DAMPs (motifs moléculaires associés aux dégâts) permettant le déclenchement de l'immunité anti-tumorale. Parmi ces agents générant des signaux de danger au sein de la cellule cancéreuse sont retrouvés les ROS (dérivés réactifs de l'oxygène) ainsi que le stress du réticulum (Obeid et al. 2007).

Au sein de la tumeur, la DC est attirée et activée via les alarmines produites par les cellules cancéreuses (Bianchi 2007). La DC capture ensuite des fragments de cellules cancéreuses par phagocytose et pinocytose qui seront présentés sur ses CMH-II et CMH-I entraînant sa maturation. La maturation entraîne des changements au niveau des récepteurs aux chimiokines exprimées, avec une perte de l'expression de CCR6 nécessaire au recrutement et au maintien de la DC au niveau du site inflammatoire et une augmentation de CCR7 qui va permettre à la DC de se relocaliser au niveau des ganglions lymphatiques (Cyster 1999). La

densité des molécules de CMH-II ainsi que de CMH-I à la surface va être augmentée. A l'état immature, le CMH II et CMH-I des cellules dendritiques se retrouvent dans les compartiments intracellulaires. Ainsi, les signaux détectés par la DC permettent son activation et la présentation des CMHs chargés du peptide (après un traitement des éléments tumoraux internalisés) à leur surface. Ces DCs matures acquièrent également la capacité de polariser la réponse immunitaire par la production de cytokines qui est déterminée par le signal de maturation reçu par la DC immature initialement (Cyster 1999). La polarisation de la réponse se fait selon le signal donné par certaines cytokines, pour la différenciation dans la voie Th1 un signal de l'IL-12 est nécessaire. Pour la différenciation dans la voie Th9, un signal d'IL-1 β , d'IL-4 et de TGF- β doit être induit. Pour la différenciation en Th2, le signal doit être donné par les cytokines IL-4 et IL-33. Pour la voie Th17, un signal gouverné par l'IL-6, l'IL-23 ainsi que le TGF- β doit être acquis. Enfin, pour la différenciation en Treg, un signal produit par l'IL-10 et le TGF- β est nécessaire (G. R. Lee 2018).

Cette étape de présentation s'accompagne d'une migration vers les organes lymphoïdes secondaires et d'une maturation qui assurent une activation efficace des lymphocytes T naïfs. L'activation efficace du LT naïf fait intervenir trois signaux différents. Tout d'abord, le LT reconnaît l'antigène porté par le CMH de la DC, il engage ensuite les molécules CD28 pour le LT et CD80/86 pour la DC permettant d'amplifier le signal du TCR par le maintien des voies de signalisation induites par ce dernier et via l'induction du calcium au sein de la cellule. Enfin, le troisième signal est caractérisé par les cytokines présentes permettant l'activation efficace du LT (dans le cas des LTs CD4, la présence des cytokines permet la polarisation du LT CD4 dans les différentes voies Th1, Th2 etc...).

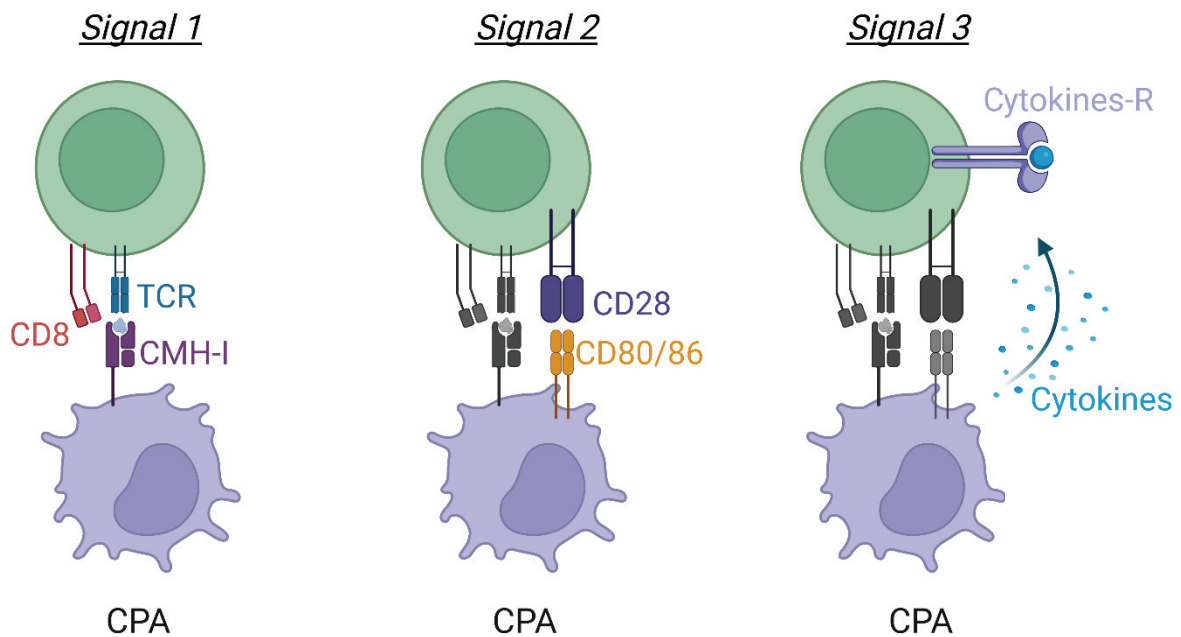


Figure 3 : Signaux nécessaires à l'activation du lymphocyte T.

Les lymphocytes naïfs au niveau du ganglion nécessitent plusieurs signaux pour leur activation. La présentation de l'antigène par la CPA au niveau du ganglion fait suite à la capture de l'antigène par la CPA et sa migration dans le ganglion. Le premier signal est la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR. Le deuxième signal est induit par les signaux de co-stimulation. Le troisième signal est caractérisé par les cytokines reçues par le LT via les récepteurs aux cytokines.

CPA : cellule présentatrice d'antigène, cytokine-R : récepteur à la cytokine

iii Présentation du peptide/CMH et activation du lymphocyte

a CMH

Deux types de CMH existent, le CMH de classe I et le CMH de classe II, qui se distinguent par leur structure et par leur distribution au niveau des cellules de l'organisme. En effet, le CMH-I, composé de la chaîne α avec les sous-unités $\alpha1$, $\alpha2$ et $\alpha3$ et de la sous-unité $\beta2$ -microglobuline, est retrouvé au niveau de l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme tandis que le CMH-II, composé de deux chaînes polypeptidiques différentes, la chaîne α et la chaîne β , est restreint aux CPA et à quelques cellules épithéliales.

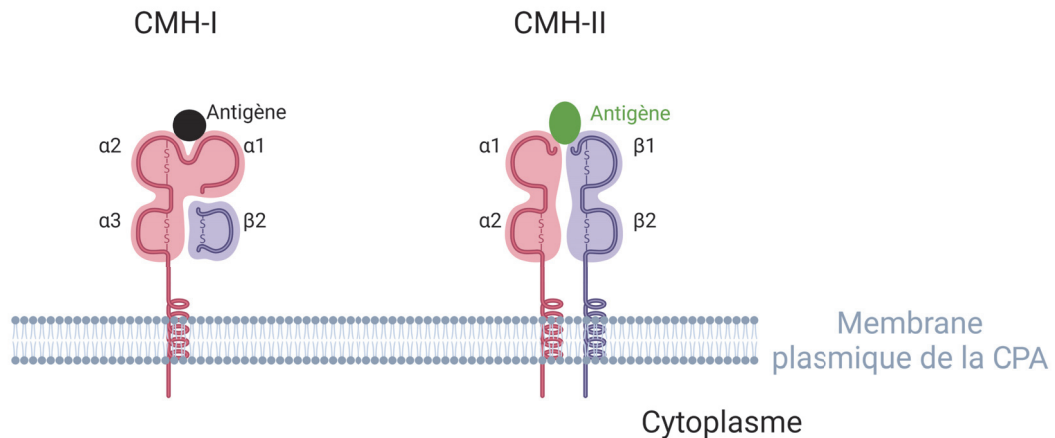


Figure 4 : Représentation schématique des CMH-I-II

Classiquement, le CMH-I présente les antigènes endogènes contrairement au CMH-II qui présente des antigènes d'origine exogène tels que des pathogènes ou d'autres cellules du corps. Un tel paradigme cependant ne permet pas d'expliquer l'activation des lymphocytes T CD8 qui reconnaissent les molécules de CMH-I par des antigènes exogènes tumoraux via les CPA. En 2005, les travaux de l'équipe d'Albert ont mis en évidence que dans les cellules dendritiques des antigènes exogènes sont chargés directement sur des CMH-I déjà présents au niveau des endosomes ou encore des phagosomes suite au renouvellement de la membrane plasmique et de façon indépendante au protéasome, aussi appelée présentation croisée (Blachère, Darnell, et Albert 2005).

Au cours de cette présentation croisée, deux grandes voies sont actuellement définies : la voie vacuolaire et la voie cytosolique. Ces deux voies ont le même commencement, qui est l'internalisation par phagocytose ou pinocytose d'éléments exogènes. Dans la voie vacuolaire, les antigènes après internalisation sont dégradés dans les compartiments endosomaux par protéolyse via des enzymes lysosomales telles que la cathepsine, puis les antigènes obtenus sont chargés dans le CMH-I. Dans la voie cytosolique, après phagocytose, la protéine exogène va être transportée dans le cytoplasme via un transporteur au niveau du phagosome, puis va être dégradée par le protéasome. Le protéasome est composé de sous-unités α et β formant un cylindre replié en 4 anneaux composés chacun de 7 sous-unités (Huber et al. 2012; Van Kaer 2001). Le protéasome semble être une étape importante de la voie cytosolique du fait qu'elle soit sensible aux inhibiteurs de ce dernier (Rock 1995). En effet, suite à la dégradation, les antigènes obtenus peuvent soit retourner dans le phagosome pour être

chargés sur le CMH-I soit être dirigés vers le RE (réticulum endoplasmique) pour subir le traitement des peptides endogènes afin de charger le CMH-I. Une fois entrés dans le RE, les peptides sont prêts à se fixer dans le CMH-I mais peuvent quand même subir un équarrissage par la protéine ERAAP avant leur fixation dans le sillon du CMH-I. Nonobstant, la fixation des peptides dans le sillon n'est pas un processus passif et nécessite l'intervention du complexe PLC (complexe de charge du peptide) dont le rôle dans ce processus est central. Au sein de ce complexe, les protéines telles que la Tapasine, la Calreticuline et ERp57 agissent de concert dans la stabilité du complexe CMH-I et de son arrimage. Une fois le CMH-I chargé avec son peptide, ce dernier subit une dernière étape de « contrôle qualité » par le complexe ERAD (complexe protéique associé au réticulum endoplasmique) qui va, si la conformation est bonne, permettre au CMH-I chargé de quitter le réticulum endoplasmique et se diriger vers la membrane cellulaire où il présentera son contenu aux LTs CD8. Ainsi, à l'issue de ces différentes voies pour la présentation croisée, le CMH-I présente des antigènes de longueur de 8 à 10 acides aminés.

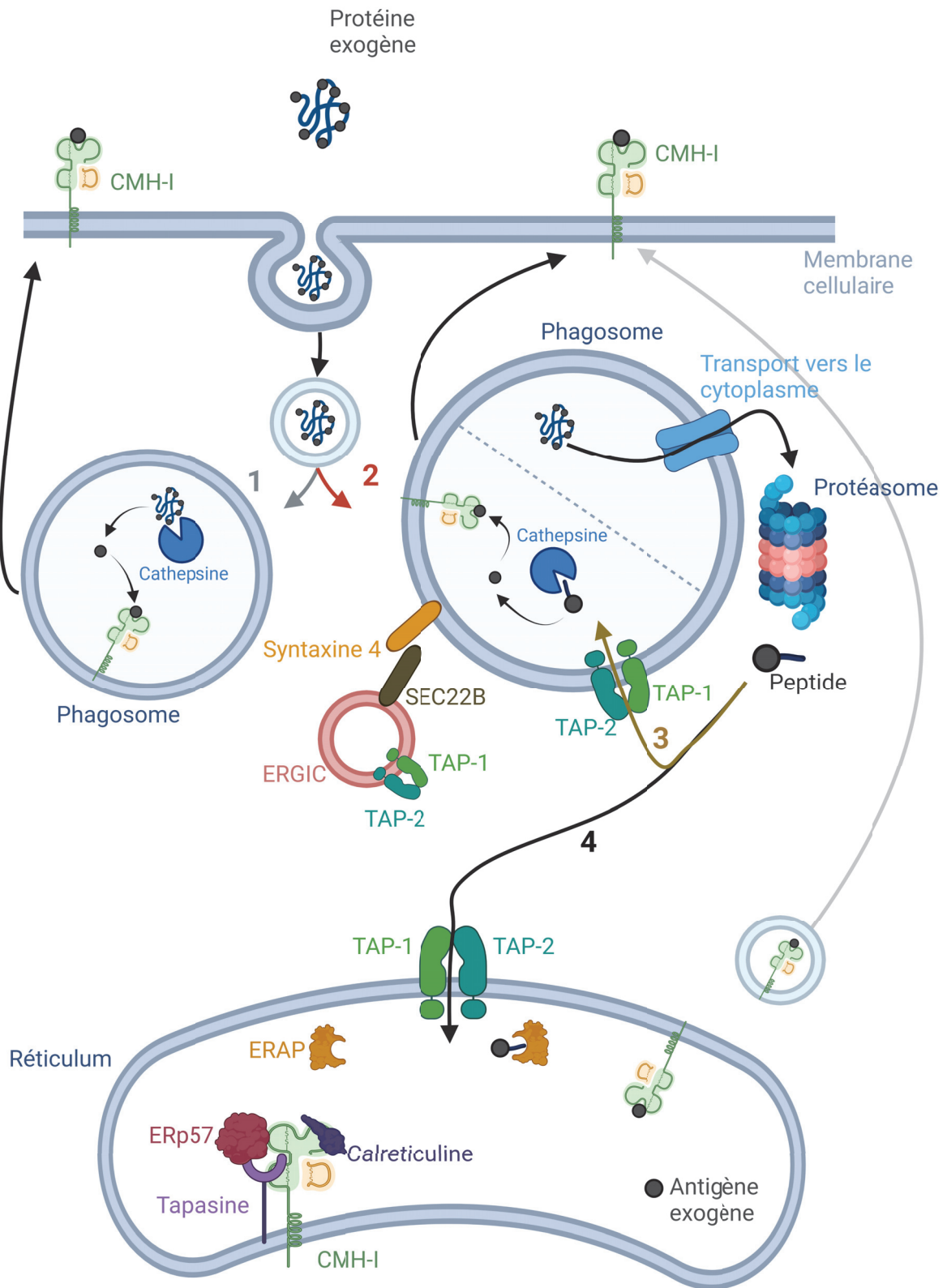


Figure 5 : Mécanismes de présentation croisée de l'antigène par le CMH-I

Suite à la phagocytose, 1) les antigènes exogènes peuvent être directement chargés sur le CMH-I au niveau du phagosome = voie vacuolaire. 2) Les antigènes exogènes au niveau du phagosome sont redirigés vers le protéasome puis entrent de nouveau dans le phagosome pour être chargés sur le CMH-I. 3) Suite à la dégradation par le protéasome, les antigènes entrent au niveau du réticulum puis vont être chargés au niveau du CMH-I. 2-3 = voie cytosolique.

CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, TAP 1 ou 2 : protéine transportrice d'antigène 1 ou 2, ERGIC : compartiment intermédiaire entre le golgi et le réticulum endoplasmique.

b Reconnaissance et stabilisation du complexe CMH-peptide et TCR

Au sein des organes lymphoïdes secondaires le contact physique entre le LT CD8 et la DC implique dans un premier temps des interactions non spécifiques du complexe CMH-I peptide et TCR. Ainsi, les molécules LFA-1 à la surface des LTs reconnaissent les molécules ICAM-1 exprimées par les DCs rapprochant leurs membranes plasmiques pour former une synapse immunologique. La molécule CD8, localisée au voisinage du TCR, contribue à rapprocher les molécules de CMH-I du TCR en se liant aux domaines $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du CMH-I (Sun, Leahy, et Kavathas 1995). La reconnaissance non spécifique se poursuit lorsque les régions CDR 1 et 2 du TCR interagissent avec le CMH (Garcia 2012). La reconnaissance spécifique implique l'interaction de CDR3, qui est la région hypervariable, avec le peptide présenté par le CMH-I qui induit un signal donné par le complexe TCR via les composants transmembranaires du CD3.

c Signalisation du TCR

Le complexe CMH-I/antigène dont l'affinité est suffisamment forte induit une activation de la voie du TCR. Ce signal initial est renforcé via un deuxième signal impliquant des molécules de co-stimulation.

Le TCR, composé d'une chaîne α et une chaîne β reliées par un pont disulfure, sans véritable domaine cytoplasmique de signalisation, est incapable d'entraîner une signalisation suite à son interaction avec le CMH/peptide. La signalisation TCR implique le complexe CD3 composé des chaînes δ , ϵ , et γ formant deux hétérodimères et d'un homodimère $\zeta\zeta$ tous liés de manière non covalente. Contrairement au TCR, ces différentes chaînes présentent des domaines ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) au niveau intracellulaire qui amorcent la signalisation suite à la reconnaissance du complexe CMH/peptide via le TCR. Le CMH-I/peptide stabilisé par la molécule CD8 (ou CD4 dans le cas du CMH-II) induit le rapprochement de la protéine LCK du complexe CD3. La protéine LCK est une kinase de la famille des protéines kinase Src composée d'un domaine SH4 (coté N-terminal), d'une région unique, des domaines SH3 et SH2 puis du domaine catalytique. Son domaine SH4 lui permet de s'ancrer à la membrane plasmique via des résidus myristoylés et palmitoylés. Une fois à proximité du complexe TCR/CD3, LCK phosphoryle l'ensemble des domaines ITAMs des différentes chaînes du complexe CD3 (Love et Hayes 2010).

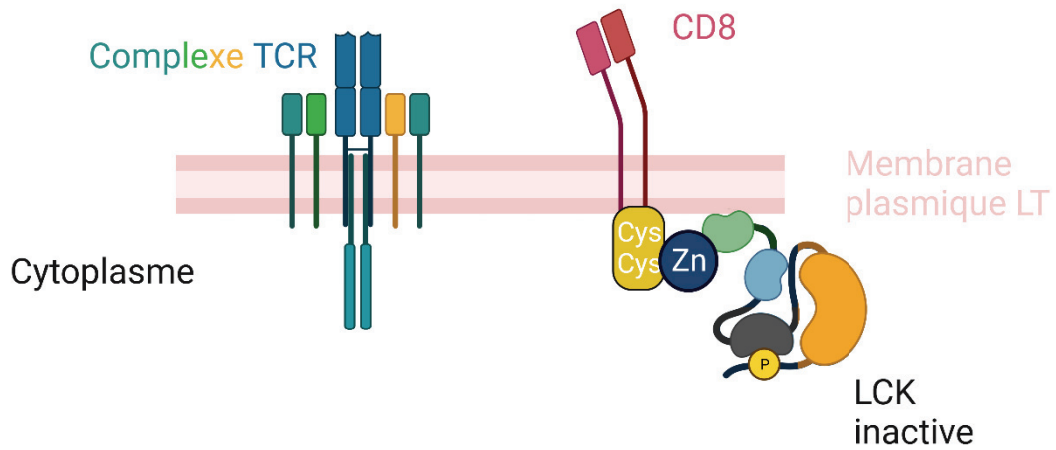
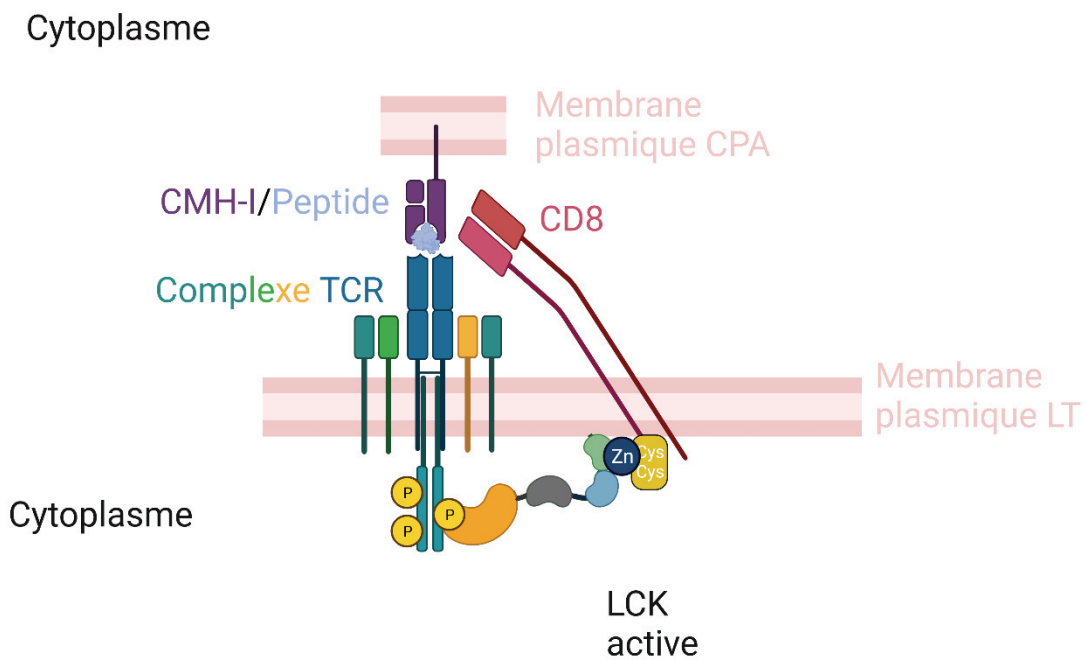
A**B**

Figure 6 : Interaction entre LCK et le TCR.

A) A l'état basal, LCK se trouve associé principalement avec le CD8 (ou CD4 dans le cas des LTs CD4). Cette interaction est possible grâce à une liaison Zinc entre le motif CxxC du domaine SH4 sur l'extrémité N-terminale de LCK et la queue cytoplasmique du CD8 (Lin, Rodriguez, et Lodish 1998; Huse, Eck, et Harrison 1998). B) La stabilisation de l'interaction CMH-I – TCR est renforcée par le CD8 lui-même associé à LCK au niveau de sa queue cytoplasmique. Le passage

de LCK dans sa conformation active permet la phosphorylation des domaines ITAMs du TCR qui permet l'initiation de la réponse du lymphocyte T.

LT : lymphocyte T, Zn : zinc, Cys : cystéine, CPA : cellules présentatrices d'antigènes, CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1, TCR : Récepteur des cellules T.

La protéine LCK est donc un acteur précoce et essentiel de l'activation et de la propagation du signal du TCR qui nécessite d'être régulé finement par des étapes de phosphorylation/déphosphorylation. Cette régulation s'opère par la phosphorylation de l'un ou l'autre des deux résidus tyrosine majoritairement fonctionnels de cette protéine menant à une conformation active ou inactive. Lorsque la tyrosine 505 (Y505) de LCK est phosphorylée, sa conformation est inactive car elle interagit avec son propre domaine SH2 provoquant un réarrangement intracellulaire et maintenant la protéine dans une conformation fermée. De plus, cette conformation est stabilisée par l'interaction entre les domaines SH3 et la région riche en proline située dans le domaine SH2 (Boggon et Eck 2004). Nonobstant, la phosphorylation de la tyrosine 394 (Y394) permet de stabiliser la conformation active de la protéine en maintenant le domaine catalytique accessible (Hiroto Yamaguchi et Hendrickson 1996; Boggon et Eck 2004). Un état intermédiaire de LCK existe au sein de la cellule dans lequel la tyrosine inhibitrice (Y505) et la tyrosine activatrice (Y394) sont toutes deux phosphorylées (Nika, Soldani, Salek, Paster, Gray, Etzensperger, Viola, et al. 2010). Dès que LCK passe dans sa conformation primée, la protéine TSA_d (T specific adaptators) peut se lier à LCK et promouvoir la conformation active. La signalisation induite par le TCR est permise par la présence de LCK actif au niveau des domaines ITAMs du TCR. En effet, il a pu être montré qu'à l'état basal dans des LTs ou au niveau de thymocytes, LCK est retrouvé dans sa conformation active sans pour autant générer la signalisation du TCR car la protéine n'est pas associée au complexe TCR (McNeill et al. 2007; Irls et al. 2003). Cependant, si LCK par mutation n'est pas phosphorylé sur Y394 alors aucune signalisation n'est possible suite à l'activation du LT (Philipsen et al. 2017).

De nombreuses protéines vont être impliquées dans la régulation de LCK favorisant ainsi sa conformation active ou inactive. La protéine CSK (C-terminal Src kinase) phosphoryle la tyrosine inactivatrice Y505 permettant l'interaction avec le domaine SH2 de LCK ce qui induit le recouvrement du domaine catalytique et ainsi, la protéine LCK se retrouve dans sa

conformation inactive. De plus, cette structure est stabilisée par l'interaction du domaine SH3 avec une région située dans le domaine entre les parties SH2 et kinase de la protéine. Il a pu être montré que la protéine PAG phosphorylée permet le recrutement de CSK au niveau des radeaux lipidiques permettant le maintien de LCK dans sa conformation inactive. Il faut l'intervention de la protéine transmembranaire CD45 pour déphosphoryler Y505 et permettre à LCK de se retrouver dans une conformation prime, c'est-à-dire prête à passer dans la conformation active. CD45, qui est une tyrosine phosphatase transmembranaire, contribue également à la déphosphorylation de la tyrosine Y394 afin de basculer LCK de la conformation alors active en conformation prime (Chakraborty et Weiss 2014). Ainsi, CD45 agit en tant que régulateur positif et négatif dans le contrôle de l'activité de LCK. Le résidu Y394 est phosphorylé par LCK lui-même dans un processus de transphosphorylation permettant l'initiation de la signalisation du TCR. D'innombrables protéines telles que DUSP22 (dual specificity protein phosphatase 22), PTPN2 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2), PTPN22, SHP1 (SH2domain-containing phosphatase 1) ont la capacité de déphosphoryler Y394 et ainsi inhiber LCK (Pao et al. 2007; J. Li et al. 2014).

A



B

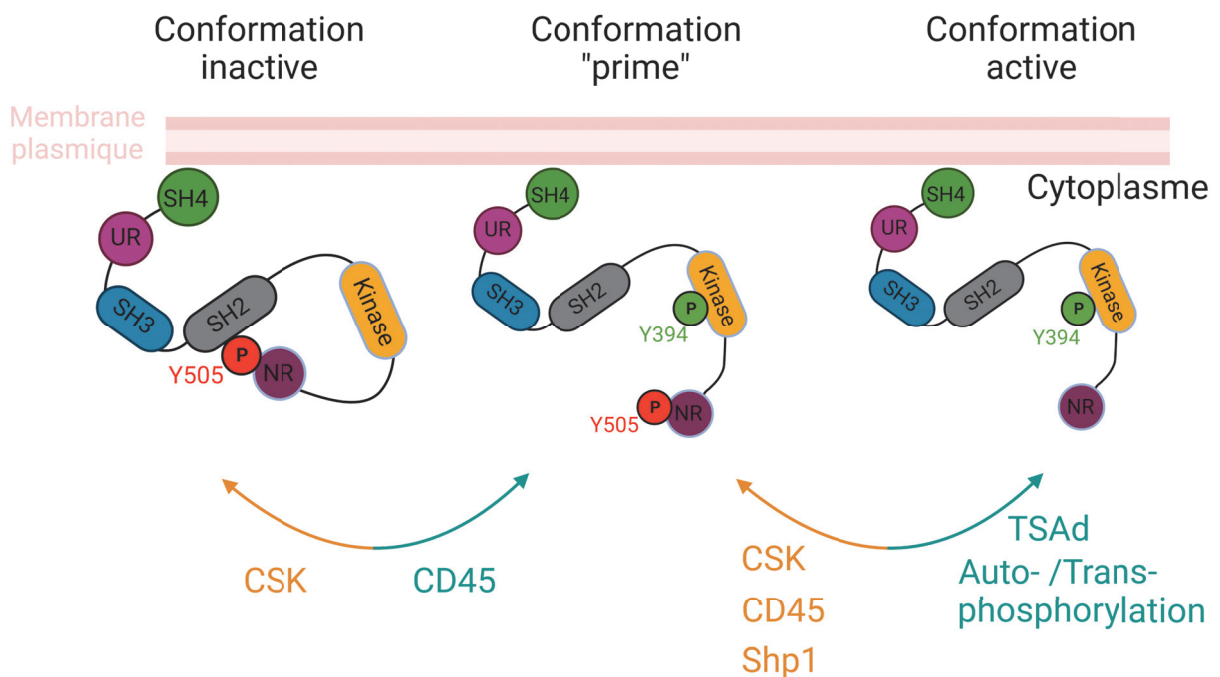


Figure 7 : Régulation de l'activité de LCK.

A) La protéine LCK est une protéine constituée de 4 domaines principaux SH4/SH3/SH2 et le domaine kinase.

B) LCK est retrouvé dans 3 conformations. La conformation inactive est phosphorylée au niveau de la tyrosine 505 (Y505) rendant le domaine kinase inaccessible. La conformation active, phosphorylée au niveau de la tyrosine 394 (Y394) et située dans le domaine kinase, permet de phosphoryler les domaines ITAMs du TCR mais également les protéines ZAP70 ou encore LAT. La conformation « prime » est un état transitoire entre la forme inactive et active, sous cette conformation la protéine LCK peut-être phosphorylée au niveau Y394 et Y505, mais elle peut également être retrouvée sans ses tyrosines phosphorylées. Le passage entre ces différentes formes est permis par des protéines telles que CSK ou encore CD45.

SH : domaine d'homologie de Src, UR : région unique, LR : région « linker », NR : queue de régulation négative C-terminale, TSA_d : adaptateur spécifique des cellules T, CSK : Src kinase C-terminale, Shp1 : phosphatase-1 contenant le domaine d'homologie de la région 2 de la Src.

La protéine LCK est retrouvée au sein de la cellule associée au co-récepteur CD8 (ou CD4) mais également retrouvée libre au sein de la cellule. Dans ce sens, l'étude de Horkova et ses collaborateurs a montré que différents effets peuvent être associés selon que LCK soit associé ou non au co-récepteur. Ainsi, ils montrent que, dans le cas du CD4, la liaison de LCK à CD4 est indispensable pour le développement et la fonction des cellules T auxiliaires. Dans le cas des LTs CD8, il est montré qu'elle facilite la réponse aux antigènes de manière kinase dépendante (Horkova et al. 2022). Il a également pu être montré, par le groupe de recherche de Vignali, un mécanisme de régulation de la signalisation du TCR par un récepteur inhibiteur qu'est LAG-3 impliquant LCK. En effet, les auteurs montrent que LAG-3 se déplace au niveau de la synapse immunologique et s'associe au complexe TCR-CD3 dans les LTs CD4 ou CD8 en l'absence de son ligand. De plus, une répétition en tandem d'acide glutamique et de proline au niveau cytoplasmique de LAG-3 permet d'abaisser le pH au niveau de la synapse immunologique et entraîne la dissociation de LCK du co-récepteur CD4 ou CD8 (Guy et al. 2022).

L'activation de LCK et la phosphorylation des domaines ITAMs sont suivies par le recrutement d'une autre protéine très importante pour la signalisation du TCR : ZAP70. LCK phosphoryle ZAP70 qui passe en conformation active et s'ancre au niveau des domaines ITAMs. ZAP70 prolonge le signal en phosphorylant et activant la protéine LAT qui active en retour différentes branches de la signalisation. Lo et ses collaborateurs ont montré que LCK peut également se fixer via son domaine SH3 à un domaine riche en proline sur LAT et se fixe également sur phospho-ZAP70 via son domaine SH2 agissant ainsi comme un pont moléculaire facilitant la colocalisation de ces deux molécules. En effet, ils ont délété dans des lignées de Jurkat la région riche en proline de LAT par CRISPR-CAS9 dans les deux allèles et observent une forte diminution de l'activation du TCR. Cependant, lorsque la délétion se limite à un allèle, la signalisation est partiellement restaurée. Par ailleurs, ils montrent que la mutation du domaine riche en proline entraîne dans le développement des LTs une accumulation des thymocytes au stade DN3 conduisant à une diminution des CD4 et CD8 matures. De plus, ils transfectent des cellules HEK293 avec une protéine LCK dont le domaine kinase est muté, ZAP70 muté induisant une perte de l'auto-inhibition et enfin avec leur protéine LAT muté ou

non pour le domaine riche en proline. Ainsi, ils montrent que la présence de LCK permet une phosphorylation plus importante de LAT induit par ZAP70 (Lo et al. 2018).

Ainsi, LCK activé permet la phosphorylation des domaines ITAMs et la suite de la signalisation du TCR peut être possible.

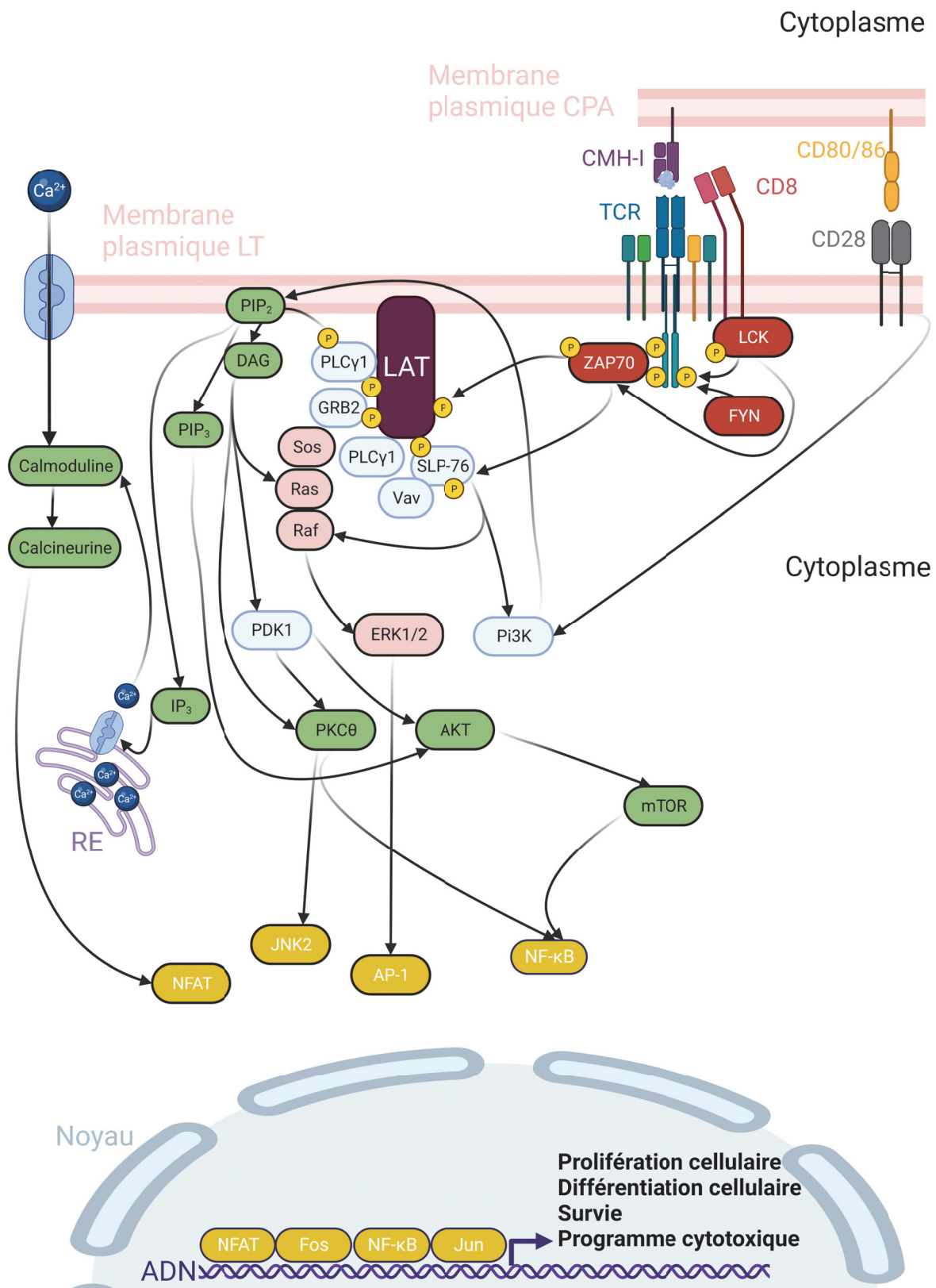


Figure 8 : Signalisation induite après l'engagement du TCR.

L'engagement du TCR suite à la reconnaissance de l'antigène résulte en l'activation des domaines ITAMs du TCR par la protéine LCK (ou encore Fyn). Cela est rapidement suivi par le recrutement et la phosphorylation de ZAP70 permettant la formation du signalosome via les protéines adaptatrices LAT, SLP76, PLC γ entraînant l'activation des voies MAPK, PI3K.

CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1, Ca²⁺ : calcium, TCR : récepteur aux cellules T, ZAP70 : protéine kinase 70 associée à la chaîne zeta, LCK : protéine tyrosine kinase spécifique au lymphocyte.

- Les protéines adaptatrices de la signalisation du TCR

La génération du signal d'activation du TCR implique des molécules de la cascade de signalisation proximale, d'où l'importance de LCK. Comme il a pu être montré, des souris dont LCK est délété ne génèrent pas de thymocytes DP (T. J. Molina et al. 1992). La phosphorylation des domaines ITAMs par LCK est suivie par la liaison de la protéine ZAP70 au niveau de ces derniers, de plus LCK peut également phosphoryler ZAP70 directement. Cela entraîne le recrutement et la phosphorylation de protéines en aval qui ont pour fonction de relier l'interaction CMH-I-TCR et la signalisation intracellulaire. ZAP70 phosphoryle ainsi la protéine LAT qui remplit une fonction critique dans la signalisation du TCR. Cette protéine agit tel un échafaudage, elle permet une fois phosphorylée, l'ancrage de plusieurs protéines contenant le domaine SH2 pour former le signalosome. L'activation de la protéine LAT permet également l'interaction avec SLP-76 qui est une protéine d'échafaudage (scaffold protein). Cette interaction permet le recrutement de molécules impliquées dans la signalisation calcique telles que PLC γ 1 ainsi que la production de DAG. Il est également retrouvé l'interaction entre la protéine LAT et Grb2 servant dans l'activation de la voie Ras. LAT et SLP-76 vont permettre le recrutement des protéines adaptatrices (telles que Grb2) permettant la continuité du signal TCR, ainsi ces deux protéines sont cruciales pour le fonctionnement et l'assemblage correct du signalosome (Jordan, Singer, et Koretzky 2003). L'engagement du TCR est suivi de l'arrangement des protéines adaptatrices générant des signaux nécessaires pour le réarrangement du cytosquelette et l'expression de gènes.

Le recrutement des protéines adaptatrices au niveau de LAT induit l'activation de 3 signaux majeurs : via la calcineurine, via l'activation de la voie des MAPKinase (mitogen-activated

proteine kinase) et via l'activation de la voie classique de NF- κ B (nuclear factor- κ B). L'activation du facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T-cells) ainsi que la translocation de Rel et NF- κ B conduisent à l'activation des facteurs de transcription FOS et JUN AP-1 (activator protein 1). Ces derniers agissent de concert pour faciliter la prolifération, la migration, la production de cytokines et la mise en place des fonctions effectrices du lymphocyte T. *In vitro* il est possible de mimer l'activation du TCR via des molécules en passant outre le recrutement des protéines telles que LCK et ZAP70. En effet, il est courant d'utiliser de la PMA (acétate de myristate de phorbol) ainsi que de la ionomycine afin de forcer l'activation des voies de signalisation du TCR. La PMA est un analogue du DAG (diacyl glycérol) permettant l'activation de PKC θ et la ionomycine est un inophore, elle permet de générer des pores au niveau du réticulum endoplasmique lisse permettant le relargage du calcium intracellulaire dans le cytoplasme conduisant à l'activation de la calcineurine.

Fyn est une protéine membre de la même famille que LCK et permet d'induire la phosphorylation des domaines ITAMs de la chaîne ζ du complexe TCR-CD3 (Hof et Resh 1999). Cependant son effet est moins déterminant que LCK. En effet, il a pu être montré par des études de délétion de ces protéines que l'ablation de Fyn n'entraîne pas de défaut de développement des LTs ou de leur réponse et ainsi l'absence de Fyn est compensable contrairement à LCK. Cela a été validé par le fait que LCK phosphoryle l'ensemble des domaines ITAMs du CD3 de manière non spécifique alors que Fyn phosphoryle que quelques résidus (Stein et al. 1992; T. J. Molina et al. 1992; Appleby et al. 1992).

- Voie de la PLC γ 1

Comme vu précédemment, LAT permet la phosphorylation de la PLC γ 1 via l'Itk et son maintien au niveau du signalosome pour son interaction avec SLP-76 et Vav1. Cela induit le clivage de PiP $_2$ en IP $_3$ et DAG qui sont appelés messagers secondaires. C'est une étape cruciale dans la signalisation du TCR car ces messagers secondaires sont essentiels dans la régulation de la fonction du lymphocyte T. Itk, qui est également connu pour phosphoryler PLC γ 1, a son activité kinase qui dépend de molécules telles que LCK et ainsi, il a pu être montré, suite à l'activation du T, qu'Itk est phosphorylé par LCK rendant les domaines SH2 et SH3 d'Itk disponibles pour interagir avec SLP-76 (Bunnell et al. 2000; Su et al. 1999; Andersen et al.

2019). Ainsi, les messagers secondaires générés permettent dans le cas de l'IP₃ d'induire le relargage du calcium dans le milieu intracellulaire provenant du RE. Cela permet l'activation des molécules dépendantes du calcium comme la calmoduline et l'induction du facteur de transcription NFAT pour ensuite permettre sa fixation à AP-1 et entraîner l'expression d'IL-2 (Lin Chen et al. 1998). Dans le cas du DAG, sa production induit l'activation de la PKC θ qui est la protéine initiant la voie des MAPK. Il a pu être montré que la protéine LCK, suite à l'engagement du TCR, est capable de phosphoryler PKC θ au niveau de la tyrosine 90 (Yuhong Liu et al. 2000).

B Les signaux de co-stimulation

Le signal donné par l'engagement du TCR n'est pas suffisant pour conduire à une activation fonctionnelle des lymphocytes T. Un signal de co-stimulation apporté par le CPA suite à sa maturation en réponse à un signal de stress ou de danger est nécessaire. Ainsi, l'absence de signal de co-stimulation, qui marque les antigènes présentés comme liés à un danger pour l'organisme, entraîne seulement l'engagement du TCR des LTs qui entrent alors en anergie. Cet état, qui protège l'organisme d'une réactivation des lymphocytes T contre les antigènes du soi acquis sans condition de danger, est un élément clef de la tolérance périphérique. Le micro-environnement tumoral ne générant pas toujours une forme de stress ou de danger, l'anergie de lymphocytes T contre les antigènes tumoraux semble être un verrou essentiel de la réponse immunitaire anti-tumorale efficace (Mueller et Schwartz 1989). Les molécules de co-stimulation lors de l'activation dans les organes lymphoïdes vont contribuer à l'activation du LT dans un premier temps puis à contrôler cette activation dans un second temps. Les cascades de signalisation induites par les molécules de co-stimulation et par le TCR se chevauchent diminuant ou favorisant l'activation du LT. De cette manière, suite à la reconnaissance de l'antigène par le LT au niveau du ganglion, le premier signal donné via les signaux de co-stimulation est un signal activateur avec une augmentation de différents co-récepteurs activateurs puis, au pic de l'activation, la balance entre co-récepteurs activateurs et inhibiteurs penche en faveur de l'inhibition avec une diminution de l'activation du LT afin d'éviter un emballement du système immunitaire.

i Les signaux activateurs

a CD28

Une des premières molécules de co-stimulation connues est le CD28 (June et al. 1990), exprimée à la surface des LTs naïfs et dont les ligands sont des membres de la famille B7, à savoir B7-1 pour le CD80 et B7-2 pour le CD86. Son implication dans l'activation du LT est prépondérante car elle contribue à l'activation de la voie PI3K induisant la voie AKT aboutissant à des changements dans l'activité métabolique suite à l'initiation des voies de prolifération et de différenciation cellulaire (Boomer et Green 2010). CD28 participe également à l'induction de la voie calcique nécessaire à l'activation du LT et conduit à l'activation de NFAT résultant en une augmentation de la production de l'IL-2 (Lieping Chen et Flies 2013). En effet, le groupe de Tuosto a montré que la présence du signal donné par CD28 améliore la signalisation du TCR car un défaut de reconnaissance lors de la présentation de l'antigène par la CPA entraîne une diminution de la phosphorylation de ZAP70 et des voies calcique/calcineurine et Erk/Mapk (Tuosto et Acuto 1998). D'autres études portant sur des souris soumises à une infection par VSV (virus de la stomatite vésiculaire) et dont CD28 est délété (Halstead et al. 2002) ont mis en lumière une diminution des effecteurs et de leur réponse cytotoxique. De ce fait, le signal transmis par le CD28 est une composante nécessaire à l'activation du lymphocyte T mais il peut également, dans certains cas, être outrepassé notamment lorsque la concentration en antigènes est importante. En effet, les groupes de Kundig et Grujic ont démontré que l'absence du signal de co-stimulation peut entraîner une réponse T efficace dans le cadre d'une infection par LCMV Armstrong (virus de la chorioméningite lymphocytaire) chez des souris dont le CD28 est délété ou les CD80/CD86 sont délétés car elles développent une réponse des LTs CD8 similaire aux souris contrôle avec aucune réduction de l'expansion clonale ou la réponse cytotoxique (Ku et al. 1996; Grujic et al. 2010). Ainsi, les auteurs montrent qu'une stimulation chronique et continue du TCR par les antigènes permet de s'affranchir du signal donné par le CD28 (Ku et al. 1996; Grujic et al. 2010).

Le signal de co-stimulation donné par le CD28 peut ainsi être vu comme un signal amplificateur nécessaire en absence d'une stimulation chronique de l'antigène lors de la présentation de ces derniers au niveau des ganglions. Ce signal peut également affecter la réponse des lymphocytes T mémoires. En effet, dans une souris dont CD28 est délété, après infection au

virus de la vaccine, les LTs mémoires expriment moins de CD27/CD122 et d'IL-2 et répondent moins bien à une seconde infection avec le même virus (Fuse, Zhang, et Usherwood 2010; Grujic et al. 2010). De plus, l'absence du signal de co-stimulation dans des souris dont CD28 est délété ou CD80/86 sont délétés provoque une forte réduction de la proportion des lymphocytes T régulateurs générés au niveau thymique chez qui les signaux du TCR et de co-stimulation induisent une expression de CD25 et des différents facteurs de transcription nécessaires à leur programme de différenciation pour la création du stock de LTrégs essentiels à l'homéostasie immunitaire (Salomon et al. 2000; Tai et al. 2005; Hinterberger et al. 2011).

b 4-1BB

4-1BB, une glycoprotéine de surface de la super famille des TNFR (tumor necrosis factor receptor) : TNFRSF9, est également un signal de co-stimulation activateur du lymphocyte T. Après la reconnaissance de 4-1BBL, ligand de 4-1BB, exprimé par les CPAs, par les cellules dendritiques ou encore par les LB, TRAF1 et TRAF2 sont recrutés au niveau de 4-1BB et induisent la signalisation des voies NF- κ B et MAPK (D. Y. Lee et al. 2013). Ainsi, la voie de signalisation induite par 4-1BB contribue à la sécrétion d'IL-2 et d'interféron γ et à la hausse des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Bfl-1 offrant ainsi une protection contre la mort des LTs CD8 suite à leur activation (H.-W. Lee et al. 2002). Contrairement au CD28, son expression dépend de la reconnaissance de l'antigène par le TCR et varie ainsi au cours de la réponse. 4-1BB peut cependant être exprimée de manière constitutive par d'autres types cellulaires à de faible niveau notamment les cellules dendritiques ou encore les lymphocytes T régulateurs (Choi et al. 2004; McHugh et al. 2002). Sous l'influence de 4-1BB, une augmentation de l'expression des ligands du CD28, CD80/86 et de la production de cytokines telles que l'IL-6 ou encore l'IL-12 peut être observée ce qui a une répercussion sur la réponse des LTs CD8 (Wilcox et al. 2002; Futagawa et al. 2002).

La présence de 4-1BB a un impact sur l'expansion clonale des LTs CD8 favorisant leur prolifération comme montré *in vitro* par le groupe de Cannons où la prolifération induite par la liaison de 4-1BB était plus importante suite à une stimulation avec un anti-CD3 (Cannons et al. 2001). De plus, une diminution importante des LTs effecteurs est observée lors d'une immunisation avec du CFA-OVA (qui est de l'ovalbumine injectée avec un adjuvant pour accentuer la réponse immunitaire) chez un modèle de souris déficientes en 4-1BB ou en son

ligand 4-1BBL (Cooper, Bansal-Pakala, et Croft 2002). En outre, la signalisation induite par 4-1BB augmente l'expression de CD25 et d'IL-2 au niveau des LTs CD8 amplifiant le signal médié par le TCR durant la phase d'expansion (Oh et al. 2015). 4-1BB aide également dans la réponse cytotoxique du CD8 comme il a été observé dans un modèle murin de la maladie du greffon contre l'hôte où l'administration d'un anticorps agoniste de 4-1BB exacerbe les dommages tissulaires causés par les LTs CD8 cytotoxiques et accélère le rejet des allogreffes cardiaques et cutanées (Shuford et al. 1997). Suite à des essais pour une application clinique, une régression de la tumeur dans le cadre de sarcome ou de mastocytome a été observée (Melero et al. 1997). De plus, l'utilisation des mêmes clones utilisés dans le cadre des maladies auto-immunes améliore la survie des souris atteintes d'EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) rendant les LTs moins actifs contre les cellules de l'hôte (Y. H. Kim et al. 2011). Ainsi 4-1BB se voit attribuer un rôle potentialisateur de la réponse des LTs CD8 mais possède également un rôle atténuateur de la réponse.

c GITR

GITR, faiblement exprimé dans un grand nombre de cellules dont les LTs, voit son expression augmenter suite à l'activation du TCR. Il est activé par son ligand GITRL exprimé principalement par les CPAs ou encore les cellules endothéliales. Le domaine cytoplasmique de GITR possède des similarités avec ceux de OX-40 (récepteur de co-stimulation activateur), 4-1BB ou encore CD27. Ainsi, le signal de GITR active TRAF3 résultant en l'activation de la voie NF- κ B et conduisant à une augmentation de la survie des T, leur activation ainsi que leur prolifération (Ronchetti et al. 2004). De plus, dans les CD8, l'activité de GITR est considérée comme indépendante de l'activation du CD28 contrairement aux LTs CD4 (Stephens et al. 2004; Ronchetti et al. 2007).

ii Les signaux répresseurs de l'activation

a CTLA-4

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein A) est plutôt caractérisé de récepteur inhibiteur de la réponse des LTs CD8 puisqu'il interagit avec les molécules CD80/CD86. Une compétition entre le CD28 et CTLA-4 s'instaure car ils partagent les mêmes ligands bien que

l'affinité de CTLA-4 soit bien plus importante (Stamper et al. 2001). Nonobstant, à l'état basal, il n'est que peu voire pas du tout exprimé. CTLA-4 n'est induit qu'après activation du LT où l'augmentation de son expression entraîne l'endocytose du CD28 (Rudd et Rudd 2009) mais également sa propre endocytose couplée au CD80/86. Celle-ci fait suite à son activation et permet une baisse du signal de co-stimulation activateur (Qureshi et al. 2011). L'activation de CTLA-4 agit également sur les radeaux lipidiques en les déstructurant diminuant ainsi le signal du TCR (M. Martin et al. 2001). Ses différentes propriétés ont fait de CTLA-4 une cible thérapeutique intéressante mais son inhibition a engendré la survenue d'une auto-immunité chez la souris et chez l'Homme où une simple mutation dans un seul des allèles du gène codant pour CTLA-4 entraîne un risque plus important de développement de maladies auto-immunes (Walker et Sansom 2011). En effet, bien que CTLA-4 bloque la réponse CD8, il est aussi exprimé par les LTrégs et son ciblage provoque alors un défaut de leurs fonctions. Liakou et ses collaborateurs ont montré que bloquer CTLA-4 diminue le nombre de LTrégs au sein de la tumeur permettant ainsi une meilleure réponse des LTs (Liakou et al. 2008). Cela illustre le rôle pivot de l'expression de CTLA-4 dans la réponse immunitaire contre les tissus sains pour prévenir le développement de maladie auto-immune mais également contre les cellules cancéreuses.

b PD-1

PD-1 (Programmed cell death protein 1), récepteur inhibiteur de la réponse immunitaire, est encodé par le gène *pdc1* et est exprimé par les LTs seulement s'ils sont activés (Agata et al. 1996) mais aussi par d'autres types cellulaires tels que les LB, les NK, les NKT ou encore les DCs. Au niveau des LTs CD8, il bloque le signal du TCR suite à la liaison avec ces ligands, PD-L1 (exprimé sur un grand nombre de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques) et PD-L2 (exprimé de façon plus restreinte par certains types cellulaires tels que les LB et les cellules dendritiques). La présence de PD-1 à la surface des LTs est induite par l'activation du LT et est transitoire si la charge virale suite à une infection aiguë est éliminée. Cependant, dans le cas d'une infection chronique ou dans le cas du cancer, l'antigène étant présent en permanence, l'expression de PD-1 reste continue et élevée conduisant à l'état d'épuisement du LT CD8. Lors de cet état, le LT perd ses capacités à proliférer mais également ses capacités cytotoxiques. (Barber et al. 2006; Crawford et al. 2014). Suite à la signalisation de PD-1, les tyrosines des

motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) et ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) sont phosphorylés menant au recrutement des phosphatases SHP1 et 2 qui déphosphorylent les chaînes CD3 et ZAP70 réduisant ainsi le signal du TCR et l'activation de PKC θ (Sheppard et al. 2004).

PD-1 est régulé par un grand nombre de facteurs de transcription notamment par NFATC1 (nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1) (Oestreich et al. 2008) qui se fixe directement au niveau des éléments régulateurs du promoteur du gène *pdc1* augmentant son expression. Foxo1 (fork-head box protein O1) régule aussi l'expression de PD-1 mais soutient également les LTs cytotoxiques pour le contrôle d'une infection virale (Staron et al. 2014). T-bet ou encore BLIMP1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) sont également connus pour réguler l'expression de PD-1 (Schildberg et al. 2016).

Des souris déficientes en PD-1 développent une auto-immunité sévère telle que la myocardite (Lucas et al. 2008) soulignant le rôle marqué de PD-1 dans le contrôle de la réponse immunitaire.

C Les cytokines

Le dernier signal nécessaire à l'activation optimale des lymphocytes T provient du signal transmis par les cytokines qui favorisent la différenciation, la survie des LTs CD8 effecteurs et le passage et la création d'une mémoire T (Mescher et al. 2006; Curtsinger et al. 2005).

i IL-2

Parmi ces cytokines, l'IL-2 joue un rôle majeur notamment dans l'expansion clonale et la survie des lymphocytes T CD8 (Morgan et Ruscetti 1976; Smith 1988). Des études *in vivo* chez des souris déficientes pour la production d'IL-2 ou pour l'expression du récepteur à l'IL-2 ont montré un défaut de lymphocytes T CD8 activés (Malek 2008).

Principalement produite par les CD4⁺ T helper dans les organes lymphoïdes secondaires, sa production est fortement potentialisée lors de la reconnaissance antigénique. Cette cytokine signale via son récepteur composé de 3 chaînes : α (CD25), β (CD122) et de la chaîne commune γ (CD132). La fixation de l'IL-2 à CD122 et CD132 induit sa signalisation qui est potentialisée par la présence de CD25, chaîne de haute affinité pour cette cytokine. Cette signalisation

induit les voies JAK-STAT via STAT5 principalement mais également la voie Pi3K ou encore la voie des MAPK (Boyman et Sprent 2012; Liao, Lin, et Leonard 2011) débouchant sur des signaux de survie et de prolifération au niveau des LTs CD8. En effet, seul un petit nombre de cellules T naïves sont spécifiques du complexe CMH/peptide et leur expansion est donc essentielle pour monter une réponse anti-tumorale efficace.

Cependant l'IL-2 est une cytokine nécessaire dans la biologie des lymphocytes T régulateurs, du fait de la forte expression de CD25 (A. Yu et al. 2015). Les modèles murins n'exprimant pas d'IL-2 ou de CD25 présentent une baisse du nombre de LT régulateurs et développent une forte auto-immunité : la colite (Fontenot, Rasmussen, et al. 2005; Burchill et al. 2007). Ainsi au niveau des LT régs la signalisation de l'IL-2 induite la voie JAK1/3 aboutissant en l'activation de STAT5 notamment au niveau des Trégs thymiques lors de leurs développement (Mahmud, Manlove, et Farrar 2013).

ii IL-12

Une autre cytokine clef de l'activation des LTs CD8 est l'IL-12. Composée de deux sous-unités, la sous-unité α (p35 de 35kDa) et la sous-unité β (p40 de 40kDa) nécessitent d'être exprimées par la même cellule (IL12p70) (Jalah et al. 2013). L'IL-12 permet d'augmenter la survie et la prolifération des LTs CD8 naïfs suite à leur activation par la DC et permet également d'améliorer la réponse anti-tumorale. Comme il a pu être montré par le groupe de Diaz-Montero, le traitement des LTs CD8 naïfs *in vitro* avec de l'IL-12 et de l'antigène spécifique Pmel-1 améliore grandement la réponse anti-tumorale médiée par les LTs CD8 chez des animaux challengés avec une tumeur B16 (Sabry et al. 2008). Dans une étude publiée il y a un an, les auteurs ont utilisé la signalisation de l'IL-12 à leur avantage dans une construction CAR. Ils ont généré un CAR dans lequel l'IL-12 a été ajouté où ils montrent ainsi que leur CAR IL-12 reprogramme le LT CD8 en une forme de cellule NK qui est capable d'éliminer les cellules cancéreuses plus efficacement (Hombach et al. 2022). L'IL-12 est produite par de nombreux types cellulaires tels que les CPAs dont les macrophages et les DCs. La liaison de la cytokine à son récepteur active TYK2 (tyrosine kinase 2) conduisant à l'activation de la voie JAK-STAT (Hunter 2005; Trinchieri, Pflanz, et Kastelein 2003).

iii Interférons de type 1

Les interférons IFN α et l'interféron β composent la famille des interférons de type 1. Ils se fixent sur l'IFNAR (IFN α β receptor composé des sous-unités IFNAR-1 et -2) recrutant des protéines kinases JAK-1 et Tyk-2 qui, à leur tour, phosphorylent les protéines STAT2 et STAT1. Cette phosphorylation conduit à leur dimérisation et leur amarrage à IRF9 qui entraîne la translocation de ce complexe nouvellement formé au niveau du noyau. L'absence de récepteurs aux interférons de type 1 sur les LTs CD8 lors d'infection au virus de la chorioméningite lymphocytaire entraîne un défaut de leur activation se traduisant par une expansion réduite conduisant à un défaut dans la génération des cellules mémoires. Cela témoigne de l'importance des IFN de type 1 lors de l'expansion clonale (Curtsinger et al. 2005; Xiao et al. 2009; Kolumam et al. 2005).

Ainsi, comme l'IL-12, les interférons de type 1 vont potentialiser la réponse des LTs CD8 en intervenant au niveau de l'expansion clonale des LTs car il a été montré que les IFNs de type I promeuvent l'activation des LTs contre les antigènes tumoraux ainsi que leur infiltration au sein de la tumeur pour une réponse anti-tumorale efficace notamment dans le cadre de l'étude effectuée par Mattiuz et collaborateurs, dans le cas de cancer du sein (Mattiuz et al. 2021; Fuertes et al. 2011). Les IFNs de type I permettent l'expression du CD25 à la surface des LTs augmentant ainsi la prolifération et donc le nombre de clones spécifiques à un antigène (Starbeck-miller, Xue, et Harty 2014).

Ainsi, dans cette première partie, nous avons pu définir les bases sur la génération des LTs CD8. Les LTs CD8 naïfs après leurs différentes sélections subies au niveau du thymus gagnent la périphérie, cependant un nombre limité de clones TCR pouvant reconnaître les cellules cancéreuses est présent au sein de l'organisme. Ainsi, la réponse anti-tumorale médiée par les LTs CD8 repose principalement sur la capacité des CPA à présenter les antigènes tumoraux de manière efficace aux LTs naïfs au sein des organes lymphoïdes secondaires. Dès l'engagement du TCR contre un complexe CMH/peptide et une activation efficace avec l'intégration des trois signaux, une expansion clonale de LTs CD8 est mise en place qui migrent des organes lymphoïdes secondaires vers la tumeur afin de rencontrer les cellules présentant l'antigène qui a permis leur activation.

II- Lymphocytes T et cancer

Les lymphocytes T CD8 sont des acteurs clef de la réponse anti-cancéreuse comme le démontrent les multiples travaux utilisant des anticorps anti-CD8 déplétants dans différents types de tumeur. La co-évolution des lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes tumoraux et des cellules cancéreuses qui subissent un fort taux de mutations constitue un pilier de la rupture de l'équilibre soit en faveur du système immunitaire soit en faveur de la tumeur.

1) Fonctions effectrices anti-cancéreuses des LTs CD8

Après leur phase d'activation et d'expansion, les clones T CD8 migrent de l'organe lymphoïde le plus proche vers le site tumoral en réponse à un gradient de chimiokines. Selon le type de tumeur cette migration est plus au moins efficace donnant lieu à des tumeurs dites chaudes si fortement infiltrées et des tumeurs dites froides si les lymphocytes restent en périphérie ainsi les tumeurs se retrouvent très peu infiltrées.

A Fonctions cytotoxiques

L'activation des fonctions cytotoxiques des LTs CD8 est basée sur la reconnaissance de l'antigène spécifique entre le complexe CMH-I/peptide de la cellule cancéreuse et le TCR du lymphocyte. Comme pour leur activation dans les organes lymphoïdes secondaires, une synapse se forme entre la membrane de la cellule cancéreuse et celle du lymphocyte. Ce complexe permet le rapprochement des cellules T et des cellules cancéreuses et le recrutement des TCRs afin d'amplifier le signal pour conduire à la mise en place du cSMAC (central supramolecular activation cluster). L'actine corticale présente au niveau du site d'interaction cellule-cellule forme un anneau périphérique appelé le pSMAC (peripheral supramolecular activation cluster). Entourant le pSMAC, au niveau du bord de la zone de contact avec la cellule, se retrouve le dSMAC (distal supramolecular activation cluster). Aux environs du cSMAC, est retrouvé un espace dans lequel sera sécrété les granules cytotoxiques du LT CD8 qui est appelé le domaine sécrétoire, ainsi la reconnaissance permet le relargage de ces vésicules cytotoxiques. L'action cytotoxique des LTs CD8 conduit à l'apoptose de cellules cancéreuses.

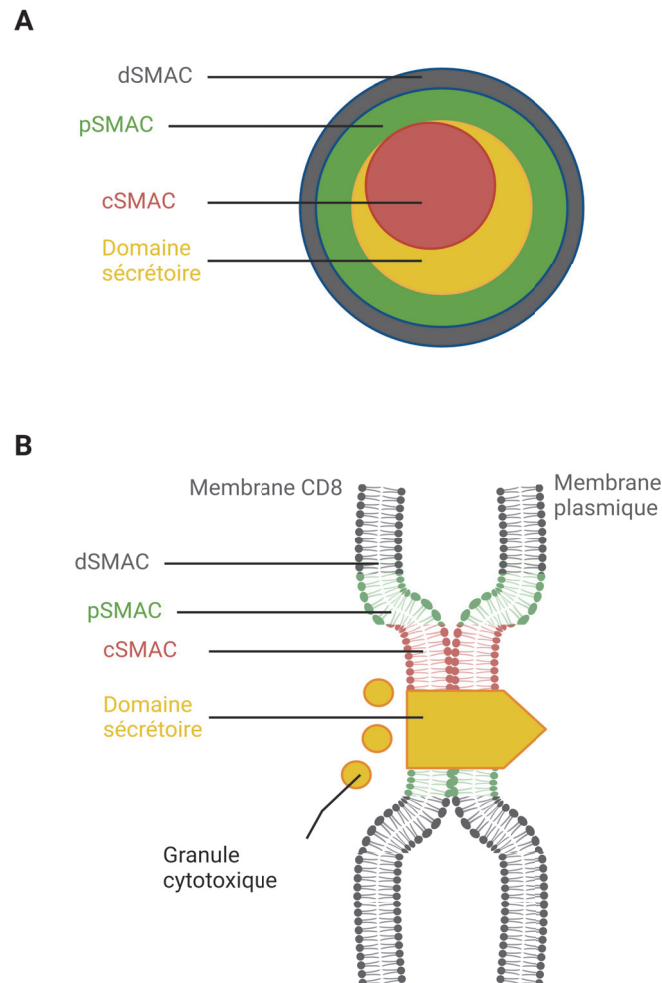


Figure 9 : Représentation schématique de la synapse immunologique. A) vue du dessus. B) vue de profil.

i La voie des perforine-granzyme

L'interaction entre les complexes TCR et CMH-I/peptide entraîne l'exocytose de granules contenant de la perforine capables de former des pores au niveau de la cellule cible permettant l'entrée du contenu des vésicules composées de granzymes et de granulysine. (Stinchcombe et Griffiths 2007). Les granzymes sont une famille de sérines protéases très large dont 5 types existent chez l'Homme : A, B, H, K et M, tandis que chez la souris, pas moins de 11 types sont dénombrés allant de A à G ainsi que K, L, M et N, (Bots et Paul 2006), les granzymes A et B étant les plus abondants. Plusieurs modes d'action ont été proposés au cours des dernières années. Des études suggèrent que la perforine est capable de générer des petits pores membranaires de 10 à 20 nm (D. Young et al. 1986; Sauer, Tschopp, et Bhakdi 1991).

D'autres modèles suggèrent que le Granzyme B (GzB) s'associe avec le récepteur M6PR (Manose-6-phosphate récepteur) à la surface de la cellule cible entraînant une endocytose du complexe (Motyka et al. 2000) qui relargue le granzyme B dans le cytoplasme où il induit l'apoptose. Cependant, il a été également montré que le GzB peut également entrer dans les cellules en absence du M6PR (Trapani et al. 2003). Un autre mécanisme d'élimination par apoptose a été décrit par lequel le GzB se fixe à la membrane cellulaire de la cellule cible et est internalisé par endocytose suite à l'entrée de calcium après la perforation de cette cellule par des perforines (Keefe et al. 2005).

Une fois dans le cytosol ces sérines protéases induisent l'activation de la caspase 3 et donc l'apoptose de la cible (Sutton et al. 2003; Waterhouse et al. 2005).

ii La voie Fas-FasL (CD95 – CD95L)

En plus de la voie granzyme perforine, les LTs CD8 effecteurs peuvent tuer les cellules cancéreuses via la voie Fas-FasL. L'interaction entre Fas exprimé par les cellules cancéreuses et son ligand exprimé par les LTs CD8 permet le recrutement du complexe DISC (Death inducing signaling complex) qui, associé à Fas, recrute la pro-caspase 8 et induit l'apoptose au sein de la cellule cible. La pro-caspase 8 active les caspases effectrices 3, 6 et 7 (Halle, Halle, et Förster 2017) ce qui a pour conséquence un clivage des protéines essentielles pour la cellule et l'activation de la DNase CAD (caspase-activated DNase) induisant l'apoptose (Strasser, Jost, et Nagata 2009). De plus, une autre voie, dépendante de la protéine BID (membre de la famille de Bcl-2), perméabilise la membrane mitochondriale externe et entraîne le relargage du cytochrome-c dans le cytoplasme une fois activée. Le relargage du cytochrome-c dans le cytoplasme forme un complexe appelé l'apoptosome qui active la caspase-9 qui, à son tour, permet d'activer les caspases effectrices 3 et 7 aboutissant à l'apoptose (Strasser, Jost, et Nagata 2009).

iii Via la production de cytokines telles que le TNF- α et l'IFN- γ

En réponse à l'engagement du TCR, les LTs CD8 expriment de fort niveau d'IFN- γ qui facilite l'apoptose par la synthèse de caspases 3 et 7. Il a pu être montré que la liaison de l'IFN- γ sur son récepteur au niveau de cellules de NSCLC (cancer du poumon non à petite cellules) induit la voie JAK-STAT1 permettant la production de caspases 3 et 7 et il a également pu être montré dans un modèle de lignée de mélanome que la voie de signalisation induite par l'IFN- γ implique la synthèse des caspases 3 et 7 pour *in fine* induire l'apoptose. (Song et al. 2019; Guinn, Brown, et Petro 2017). De plus, l'IFN- γ joue un rôle dans la motilité des LTs CD8 et améliore leur capacité cytotoxique, en induisant une production plus importante des chimiokines par les cellules au sein de la tumeur mais également des molécules d'adhésion par les LTs. En effet, la délétion de l'IFN- γ entraîne une nette réduction de la réponse cytotoxique contre des cellules cancéreuses exprimant l'antigène cible, de même *in vivo* lors de l'utilisation d'un anticorps anti-IFN- γ (Bhat et al. 2017). L'IFN- γ promeut l'expression du CMH-I sur les cellules cancéreuses et participe à la régulation de l'homéostasie en contribuant à la destruction vasculaire et en réprimant la néoangiogenèse des vaisseaux qui irriguent la tumeur favorisant ainsi la nécrose (Briesemeister et al. 2010; Kammertoens et al. 2017). Enfin, l'IFN- γ , en combinaison avec d'autres cytokines notamment le TNF- α , permet l'entrée en sénescence des cellules cancéreuses ou leur entrée en dormance, un état pendant lequel les cellules tumorales persistent en équilibre avec les cellules de l'hôte sans que la tumeur ne croît (Mu et al. 2008; Yuying Liu et al. 2017).

Le TNF- α est une cytokine qui possède des effets antagonistes, pro-tumoraux (Sethi, Sung, et Aggarwal 2008) et anti-tumoraux, dépendants du contexte tumoral et de l'origine de production du TNF- α (Page, Bester, et Pretorius 2018; Junaliah et al. 2020). Le TNF- α peut être produit par la tumeur mais également par les lymphocytes T cytotoxiques. En effet, le TNF- α bloque l'efficacité des LTrégs et permet une meilleure activation des NKs (H. Nie et al. 2013; Valencia et al. 2006) et le recrutement de neutrophiles au sein de la tumeur pour une réponse anti-tumorale où il entraîne également un passage de TAMs (tumors associated macrophages) en macrophages M1 (Lejeune et al. 2006; Qiao et al. 2011). Le TNF- α induit également l'apoptose suite à sa fixation sur son récepteur (TNF-R1). La cascade de signalisation induite par le TNF- α met en lumière deux voies importantes, celle passant par TRAF2 mais conduisant à la résistance à l'apoptose ainsi que la prolifération des cellules cancéreuses et la voie impliquant RIPK1 induisant l'apoptose. Ainsi, une stimulation chronique et à faible dose de

TNF- α entraînerait au niveau des cellules cancéreuses une activation majoritaire de la voie TRAF2 promouvant la prolifération cellulaire. Au contraire, une dose importante active la voie RIPK1 qui aboutirait à la mort des cellules cibles. Il a pu être montré qu'une combinaison avec un agoniste de FN14 (qui est le récepteur de la protéine TWEAK) permet la dégradation lysosomale de TRAF2 (Vince et al. 2008) ce qui entraîne l'activation de la voie RIPK1 dans les cellules cancéreuses suggérant un mécanisme par lequel les cellules cancéreuses détournent l'action de cette cytokine (Vredevoogd et al. 2019).

2) Stratégie d'échappement de la tumeur

La réponse immunitaire anti-tumorale repose sur deux principes : l'immuno-surveillance et l'immuno-édition. Le concept d'immuno-surveillance postule que le système immunitaire (SI) est sans cesse à l'affût des cellules tumorales et qu'il est capable de les éliminer. Par ailleurs, la théorie de l'immuno-édition propose que la croissance tumorale est influencée par la pression de l'immuno-surveillance et en résulte l'échappement du cancer vis-à-vis du SI. Au cours de cette phase d'échappement, les cellules malignes sont capables de résister à leur élimination par le SI et parfois de détourner le SI contre l'hôte à leur propre avantage (Dunn et al. 2002).

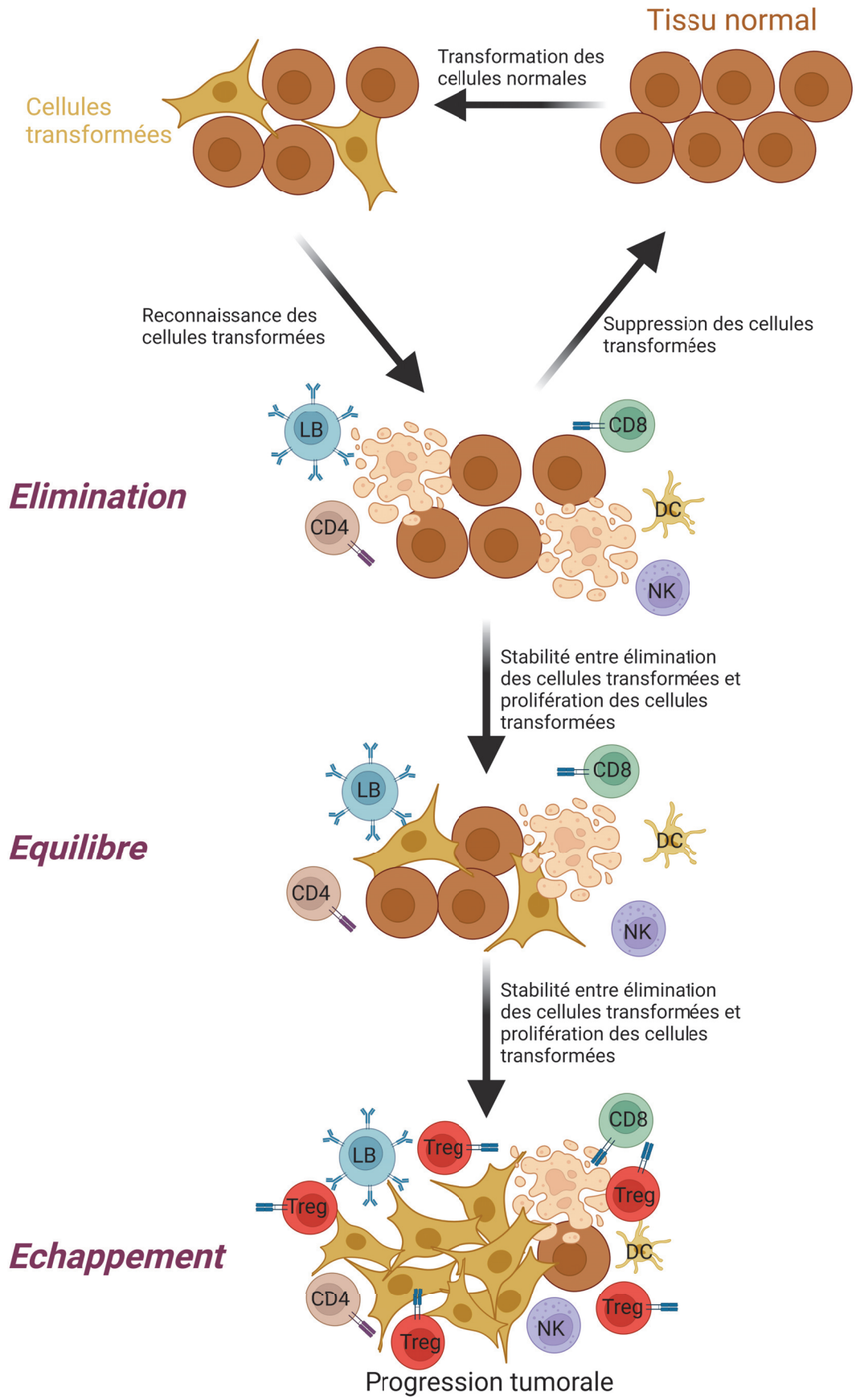


Figure 10 : L'immuno-édition

Différents facteurs vus dans la figure 11 « les caractéristiques du cancer » peuvent entraîner la transformation des cellules saines en cellules transformées qui sont à l'initiation de la mise en place des tumeurs. Ces cellules vont exprimer des antigènes permettant la réponse du système immunitaire appelée phase d'élimination. De manière générale, l'élimination par le système immunitaire est suffisante et ces cellules transformées ne sont jamais cliniquement détectables. Cependant, dans certains cas, ces cellules transformées persistent et le système immunitaire ne parvient plus à éliminer l'ensemble des cellules transformées. Cependant, ces dernières ne prolifèrent pas de manière anarchique et sont toujours sous contrôle : c'est la phase d'équilibre. Due à la pression de sélection imposée par le système immunitaire et par les capacités intrinsèques des cellules transformées, ces dernières vont être capables de proliférer sans être inquiétées par le système immunitaire et d'entraîner la mise en place de la tumeur : la phase d'échappement.

LB : lymphocyte B, NK : cellule tueuse naturelle, CD4 : lymphocyte T CD4, CD8 : lymphocyte T CD8, DC : cellule dendritique.

3) L'immuno-surveillance

La cellule cancéreuse se développe au sein de l'organisme suite à de nombreuses altérations au niveau de son ADN notamment au niveau des gènes impliqués dans la division cellulaire, le contrôle de l'apoptose ou encore la prolifération cellulaire. De ce fait, les cellules transformées favorisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines par leur micro-environnement recrutant des cellules dendritiques et puis des lymphocytes T activés et NKs capables d'éliminer les cellules transformées.

Une phase d'équilibre due à la co-évolution des deux systèmes peut se mettre en place. Durant cette période asymptomatique, le SI élimine une grande partie des cellules cancéreuses, mais d'autres apparaissent qui sont éliminées sans pouvoir donner naissance à une tumeur. Cet état physiologique a notamment été révélé lors de transplantation hépatique de patient « sain » chez des receveurs immunodéprimés. Ces derniers ont présenté un hépatocarcinome quelques mois après la transplanation.

Cependant, le délai de 5 à 7 jours pour mettre en place une réponse T effectrice et le fort taux mutationnel des cellules cancéreuses peuvent conduire ces dernières à favoriser les mutations donnant des cellules peu immunogènes pour les clones T en place. Par ailleurs, les cellules transformées peuvent présenter des mutations ou des modifications épigénétiques qui conduisent à leur résistance à l'apoptose induite par les LTs ou les NKs voire à acquérir des molécules qui bloquent ou éliminent les lymphocytes T. Ainsi, une phase d'échappement passive est décrite au cours de laquelle les cellules transformées amenuisent leur capacité à être la cible des lymphocytes T CD8 par la diminution de l'expression de leurs CMH-I et par une résistance à l'apoptose.

Une forme d'échappement active a été décrite dans certains cancers. Les cellules transformées peuvent surexprimer des molécules apoptotiques comme TRAIL ou fasL et éliminer les lymphocytes T (Gasser et al. 2010; Jingjing Zhu et al. 2017). Elles peuvent aussi exprimer des molécules répressives de l'action des LTs à leur surface comme PD-L1 (Würfel et al. 2019; Salmaninejad 2019) et/ou produire des cytokines immunosuppressives dont l'IL-10, le TGF- β , l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO). Ces mécanismes favorisent le développement des LTs régulateurs qui diminuent la réponse cytotoxique et favorisent la croissance tumorale (Burkholder et al. 2014).

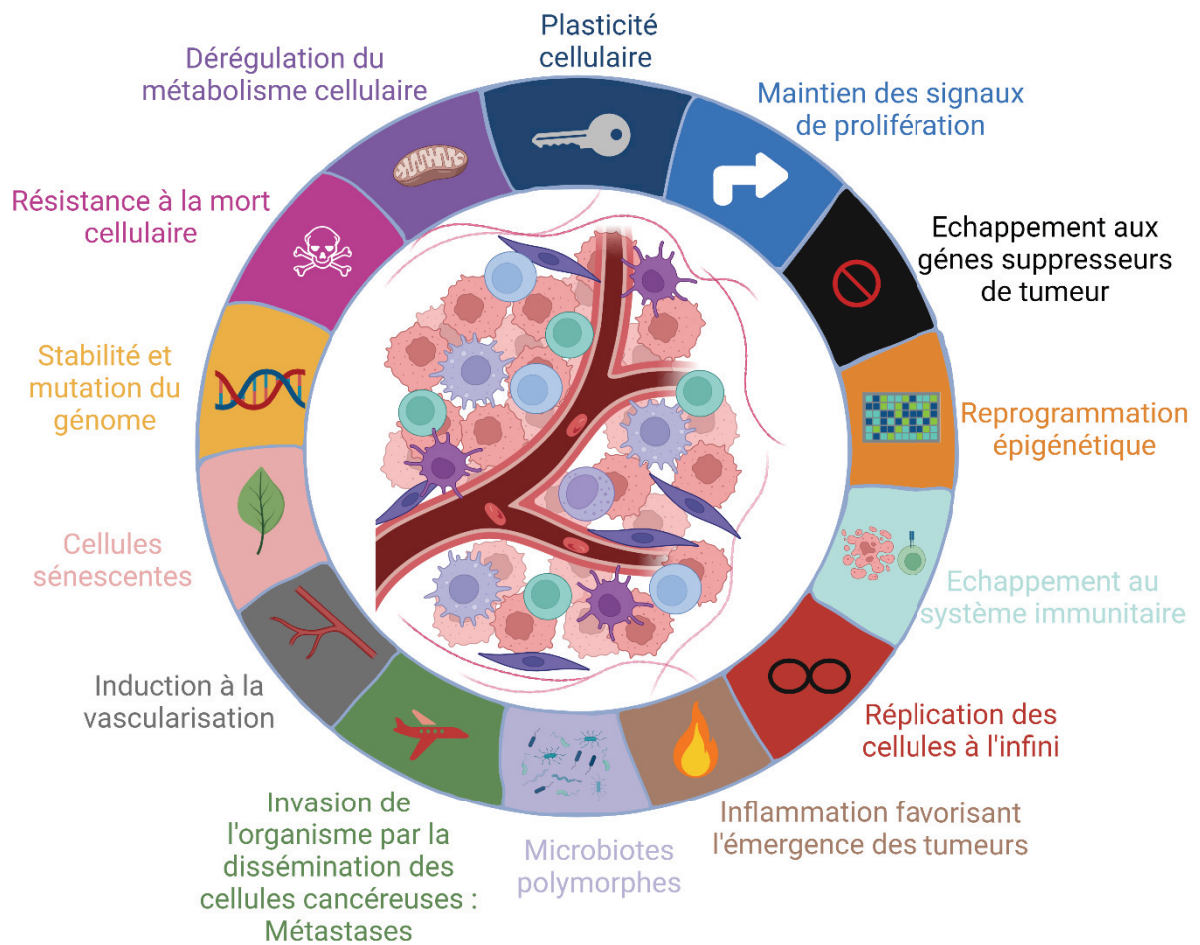


Figure 11 : Les caractéristiques du cancer.

Les caractéristiques des cellules cancéreuses qui peuvent être acquises tout au long du processus de mise en place et du développement de la tumeur, certaines nécessaires dans le développement de métastases.

De nombreuses études ont pu mettre en évidence les propriétés des cellules cancéreuses par rapport aux cellules « normales » qui, d'après la description de Hanahan et Weinberg, possèdent (Hanahan 2022) :

- une indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération,
- une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs,
- une capacité métastatique et d'invasion plus importante,
- une prolifération incontrôlée (perte des mécanismes de sénescence),
- une capacité à l'angiogenèse,
- une résistance à l'apoptose,

- une capacité à contourner le système immunitaire,
- un contexte inflammatoire favorisant leur développement,
- une instabilité génomique (entraînant l'apparition d'un grand nombre de mutations),
- une dérégulation du métabolisme cellulaire.

A Lieu peu immunogène

Certains organes tels que le cerveau, l'œil, les testicules ou la poche des joues des hamsters constituent des sites immuno-privilegiés, où la réponse immunitaire est très faible, favorisant ainsi le maintien des cellules cancéreuses. L'induction de l'anergie est également un mécanisme permettant la tolérance. En effet, le LT rencontre l'antigène donné mais ne reçoit pas l'ensemble des signaux nécessaires à son activation complète rendant le LT incapable de mettre en place une réponse efficace. La production de ligands inhibiteurs tels que CTLA-4 par des cellules présentatrices d'antigènes tolérogènes peut également être un mécanisme permettant cette tolérance. Enfin, une population du système immunitaire, les lymphocytes T régulateurs (T régs), permet le maintien de la tolérance en induisant l'inhibition de la réponse immunitaire.

i Tumeurs chaudes et froides

Il est possible de classer les tumeurs en deux grands types, les tumeurs « froides » qui sont des tumeurs dont l'infiltrat immunitaire est très faible et a contrario les tumeurs « chaudes » qui sont des tumeurs avec un infiltrat immunitaire très important qui, généralement, répondent bien mieux aux traitements ciblant les « immune checkpoint inhibitors ».

La baisse de l'immunogénéicité pour ce type de tumeur se déroule de plusieurs manières. Les clones les plus réactifs sont éliminés lors de la formation de la tumeur permettant l'émergence de clones très peu immunogènes aboutissant à une tumeur « invisible » pour le système immunitaire car les antigènes exprimés à leur surface ne sont pas détectés (Dunn, Old, et Schreiber 2004; Coulie, Eynde, et Bruggen 2014; J. M. Kim et Chen 2016).

Parmi l'ensemble des mécanismes mis en place par la tumeur, la maturation des DCs normalement induite par les DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) tels que l'ATP ou encore HMGB1 (high mobility group box 1 domain) (X. Zhu et al. 2009) est inhibée par l'expression de différentes cytokines telles que le VEGF (GABRILOVICH et al. 1996), le MCSF (macrophage colony stimulating factor) (Nefedova et al. 2004) ou encore le TGF- β (Zong et al. 2016). De plus, les cellules immunosuppressives dans le MET (micro-environnement tumoral) comme les LTrégs ou encore les MDSCs (myeloid derived suppressor cells) expriment des facteurs inhibiteurs pour réduire la maturation des cellules dendritiques, la diminution de l'expression du CMH entraînant la diminution de la production des cytokines anti-tumorales telles que l'IL-12 ou encore l'IFN- γ . Ces facteurs dont l'Arg1, iNOS, TGF- β , IL-10, COX2 et IDO peuvent être exprimés par les MDSCs et certains également par les LTs régs. Ces deux populations de cellules sont recrutées au sein de la tumeur via CCL2, CCL5, CCL22 ou encore CXCL12 (C. Li et al. 2020; J. M. Kim et Chen 2016; Gonzalez, Hagerling, et Werb 2018). Il a aussi été montré que les tumeurs sont capables de bloquer l'activité des LTs CD8 en limitant les signaux de co-stimulation requis pour leur activation. L'absence de signaux de co-stimulation malgré l'activation du TCR rendent les LTs CD8 anergiques (Lieping Chen et Flies 2013). En effet, il existe un profond déséquilibre entre les signaux co-activateurs et co-inhibiteurs au sein du MET. Il a pu être montré que les CPA associées aux tumeurs peuvent exprimer de fort taux de PD-L1, PD-L2, B7x ou encore de ICOS-L, cependant avec une faible expression voire une absence des molécules CD80 et CD86 (Zou et Chen 2008; Curiel et al. 2003; Kryczek et al. 2006). L'inhibition de la réponse CD8 peut également se faire suite à un défaut de leur recrutement au niveau de la tumeur et à la diminution de l'expression des ligands de CXCR3, récepteur exprimé par les LTs CD8 pour migrer vers la tumeur exprimant les ligands pour ce dernier tels que CXCL9/10 (Karin 2020). La tumeur produit des facteurs tels que le VEGF afin de diminuer l'entrée des LTs CD8 au sein de la tumeur en diminuant le nombre de vaisseaux TA-HEVs (Tumor associated High endothelial veinules) associés à un infiltrat immunitaire important et de bon pronostic dans l'élimination de la tumeur lorsqu'ils sont présents (Asrir et al. 2022). De plus, pour les tumeurs dites « froides », une notion supplémentaire, qui est l'exclusion du système immunitaire, explique cette faible voire absence d'immunogénéité. L'exclusion est définie par la présence de LTs uniquement en périphérie de la tumeur. Plusieurs pistes peuvent expliquer ce phénotype particulier. En effet, dans un premier lieu, la tumeur peut mettre en place des barrières mécaniques empêchant l'entrée physique des LTs

au sein de la tumeur. En effet, il a pu être observé chez des patients que l'expression de DST (protéine desmosale dystonine) et de FLG (flagrin) a permis d'identifier des cas de mélanomes avec une absence totale de LTs CD8 (Salerno et al. 2016). La tumeur peut, en plus d'une barrière physique (qui peut également être induite par d'autres facteurs tels que le TGF- β), mettre en place une barrière « fonctionnelle ». Les cellules cancéreuses apoptotiques vont produire des signaux « don't eat me » ce qui rendent la présentation des antigènes tumoraux plus difficile (Matlung, Szilagyi, et Timo 2017).

ii Pour les tumeurs dites chaudes

Ces tumeurs, bien plus infiltrées par le système immunitaire, mettent en place d'autres moyens de contourner la réponse de ce dernier. En effet, les tumeurs sont capables de réduire l'expression de leur CMH-I à la surface à la suite de mutations spontanées et indirectement d'impacter la présentation du peptide (Dhatchinamoorthy, Colbert, et Rock 2021). De plus, des mutations ou des modifications épigénétiques au niveau des protéines TAP1/TAP2 responsables du transport des antigènes dans le protéasome peuvent apparaître (Taylor et Balko 2022).

Les LTs CD8 infiltrant la tumeur expriment également les récepteurs immunitaires inhibiteurs tels que PD-1, BTLA ou encore Tim-3 qui sont, à des stades précoces, synonymes de leur l'activation effective. Un autre mécanisme d'échappement de la tumeur est donc la production de ligands inhibiteurs, cibles particulièrement étudiées dans les immunothérapies actuelles. De plus, au sein de la tumeur, est retrouvée l'enzyme IDO qui est une enzyme métabolisant le tryptophane, acide aminé essentiel pour la réponse immunitaire, en kynurénine (qui est toxique pour les LTs). La déplétion du tryptophane dans le micro-environnement engendre l'anergie des LTs amplifiée par l'augmentation de la kynurénine qui a un effet immunosuppresseur et favorise l'émergence de LTrégs. En effet, il a pu être montré qu'en présence d'un inhibiteur d'IDO1, la croissance tumorale est contrôlée de manière lymphocyte dépendante (X. Liu et al. 2010; Opitz et al. 2011; Pilotte et al. 2012).

B Les lymphocytes T régulateurs répresseurs de l'activité cytotoxique

Si la tumeur développe des mécanismes pour contrecarrer la réponse immunitaire, le système comprend aussi des acteurs qui favorisent la croissance tumorale en inhibant la réponse cytotoxique. Un de ces acteurs majeurs est les lymphocytes T régulateurs. C'est une population qui prend naissance au niveau du thymus et dont la génération diffère légèrement des LTs conventionnels. De plus, les T régs peuvent également avoir une origine périphérique. Cette population est caractérisée par l'expression d'un facteur de transcription Foxp3 (chez la souris, ce facteur est suffisant pour discriminer les LTrégs, cependant chez l'Homme, la caractérisation des T régs ne se résume pas uniquement à l'expression de Foxp3).

L'effet des LTrégs sur la croissance tumorale a été confirmé *in vivo* par l'utilisation de souris FoxP3^{DTR} qui, après injection de toxine diphtérique permettant la déplétion des LTrégs, entraîne un retard de croissance de la tumeur (Bos et al. 2013; Gyori et al. 2018). Très souvent, la présence de cette population immunitaire au sein de la tumeur est associée à un mauvais pronostic. Pour les tumeurs résultant d'une inflammation chronique, comme celle du côlon, la présence de LTrégs peut être de bon pronostic (Tanaka et Sakaguchi 2017). Le T rég exprime fortement CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, qui lui permet d'entrer en compétition avec les CTLs pour l'IL-2 présent dans le micro-environnement entraînant l'anergie ou encore l'apoptose des CTLs. Une autre compétition se fait via l'expression du CTLA-4 par le T rég. L'affinité de CTLA-4 pour le CD80/86 est bien plus importante que celle pour le CD28 exprimé par les lymphocytes T CD8 provoquant ainsi une diminution du signal de co-stimulation au niveau des lymphocytes T CD8. Les LTrégs peuvent également via la production de perforines et granzymes éliminer par apoptose les lymphocytes cytotoxiques. Les T régs régulent de manière indirecte le métabolisme des lymphocytes cytotoxiques en transformant l'ATP en ADP via l'expression de CD39 et CD73 ce qui entraîne la production de cytokines immunosuppressives mais également diminue la fonctionnalité des cellules dendritiques et des CTLs. Les LTrégs produisent également des cytokines immunosuppressives telles que le TGF- β et l'IL-10 qui entraînent une diminution de l'activité des lymphocytes cytotoxiques. Les cytokines immunosuppressives produites par les LTrégs induisent la génération de cellules dendritiques dites tolérogènes sécrétant l'IDO qui entraîne la transformation du tryptophane en kynurénine qui est toxique pour les lymphocytes cytotoxiques.

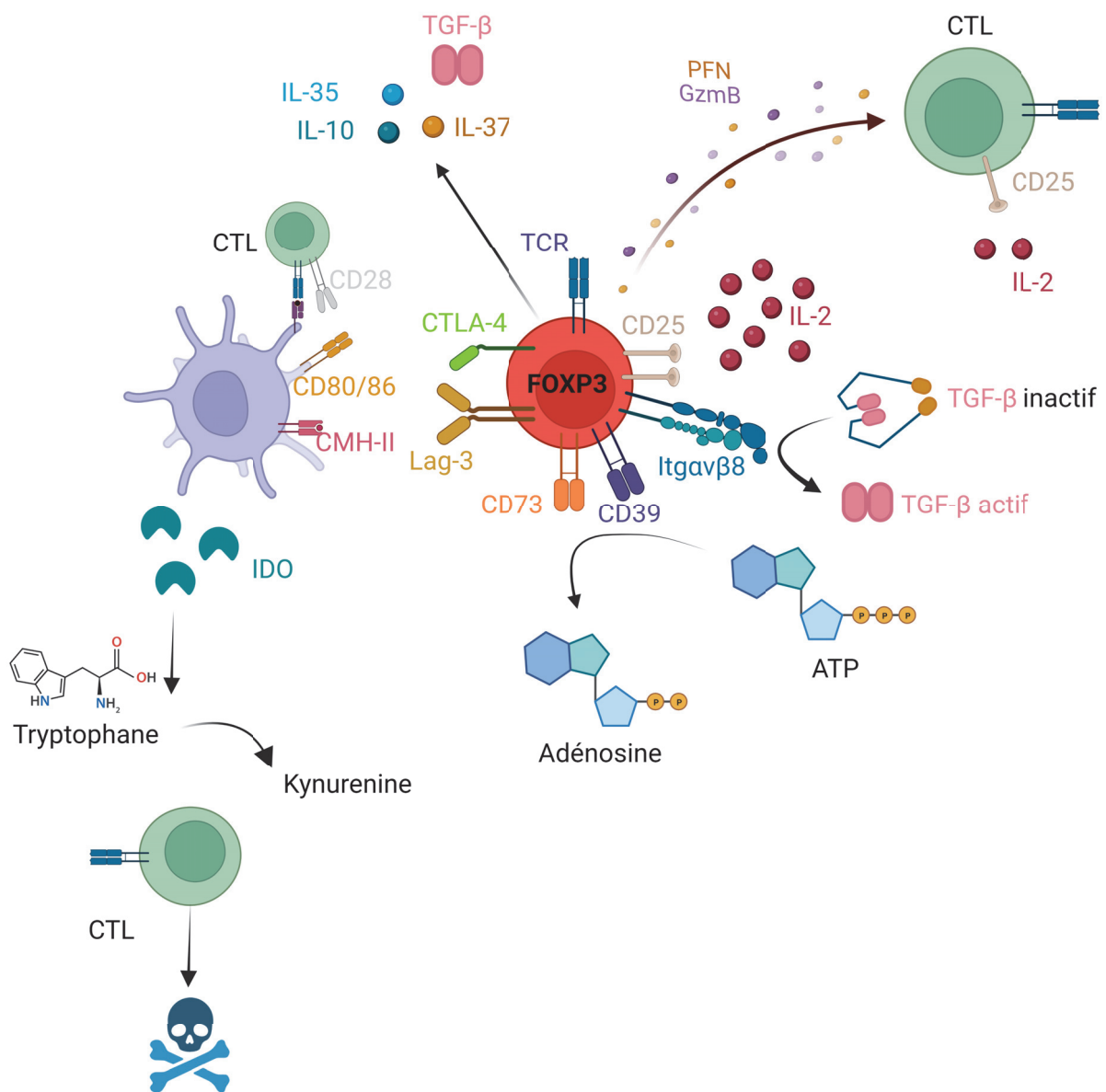


Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes suppresseurs de la réponse immunitaire induits par le lymphocyte T régulateur.

Les LTrégs sont des cellules de l'immunité adaptative permettant le contrôle de la réponse immunitaire dont l'absence au sein de l'organisme conduit à de nombreux types d'auto-immunité. La cellule dispose de nombreux moyens pour freiner/réprimer la réponse immunitaire.

CTL : lymphocyte T cytotoxique, PFN : perforine, GzB : granzyme B, TCR : récepteur des cellules T, ATP : adénosine tri-phosphate, IDO : indoléamine 2,3 dioxygénase

4) TGF- β , une cytokine régulatrice de la réponse T anti cancer

En plus de facteurs cellulaires, des cytokines peuvent conduire à freiner la réponse T cytotoxique et favoriser la croissance tumorale. Parmi elles, le TGF- β est considéré comme la cytokine la plus immunosuppressive. Ce polypeptide, hautement conservé chez les mammifères, est impliqué dans de nombreux mécanismes tels que la différenciation cellulaire, la prolifération, la migration, l'embryogenèse, la réparation tissulaire ou encore dans la modulation de l'inflammation. Trois isoformes sont retrouvées chez les mammifères, TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 codées chacune par un gène distinct mais possédant des homologies de séquences et partageant également le même récepteur bien que leurs actions ne soient pas redondantes (Travis et Sheppard 2014a). L'isoforme prévalente au sein du système immunitaire et des tumeurs est le TGF- β 1 (Teicher 2007). Si l'absence du TGF- β 2 ou TGF- β 3 entraîne une mort au stade embryonnaire des animaux (Sanford et al. 1997), pour les souris déficientes en TGF- β 1, la moitié meurent au stade embryonnaire (Dickson et al. 1995) et l'autre moitié développe des maladies auto-immunes sévères qui touchent tous les organes et finissent par mourir entre 3 à 5 semaines (Shull et al. 1992; Kulkarni et al. 1993).

A Production

Le TGF- β est synthétisé sous forme de pré-pro-TGF- β , au niveau du réticulum endoplasmique rugueux RE. Il est composé d'un peptide signal, d'une région LAP (Latency associated complex) en N-terminal et d'une région en C-terminal qui est le TGF- β mature. Le passage dans le RE se fait suite au clivage du peptide signal libérant ainsi le pré-pro-TGF- β dans le lumen du réticulum endoplasmique. Au niveau du RE, le complexe LAP/TGF- β , aussi appelé pro-TGF- β , se dimérise via des ponts disulfures. Le polypeptide est alors clivé par la furine entre les régions N-terminale et C-terminale conduisant au repliement du LAP qui masque le site d'interaction du TGF- β mature avec son récepteur. L'ensemble du complexe est maintenu via des liaisons hydrogènes et est appelé Small latent complex (SLC) (Dubois et al. 1995; Dubois et Leduc 2001).

Le SLC peut s'associer au LTBP (latent TGF- β binding protein) via la cystéine 33 du LAP. Le LTBP est produit en parallèle de la dimérisation du pro-TGF- β . Le complexe formé de LTBP et de SLC

est appelé LLC (large Latent Complex). LTBP, protéine de la matrice extracellulaire, permet le stockage du TGF- β sous sa forme inactive au sein de cette dernière (Robertson et Rifkin 2016). Cependant, le SLC peut également être maintenu au niveau de la membrane des cellules via la protéine GARP (Glycoprotein A repetition predominant protein). GARP est principalement produit par l'endothélium ou encore les LTrégs activés (Tran et al. 2009; Stockis et al. 2009; R. Wang et al. 2012). Le TGF- β inactif peut également se fixer avec NRROS (negative regulator of reactive oxygen species – LRRC33) au niveau de la microglie (Qin et al. 2018) et au niveau des cellules de la lignée myéloïde telles que les macrophages ou les cellules dendritiques (Qin et al. 2018). Cependant, LRRC33 ou encore NRROS chez l'Homme lie seulement l'isoforme TGF- β 1 contrairement à GARP (LRRC32) qui est capable de lier les 3 isoformes du TGF- β (Duan et al. 2022).

Ainsi, le TGF- β est produit par un grand nombre de cellules dont les cellules cancéreuses et est sécrété sous une forme inactive incapable d'interagir avec son récepteur. Les effets du TGF- β diffèrent selon les cellules, sa localisation mais également son accessibilité.

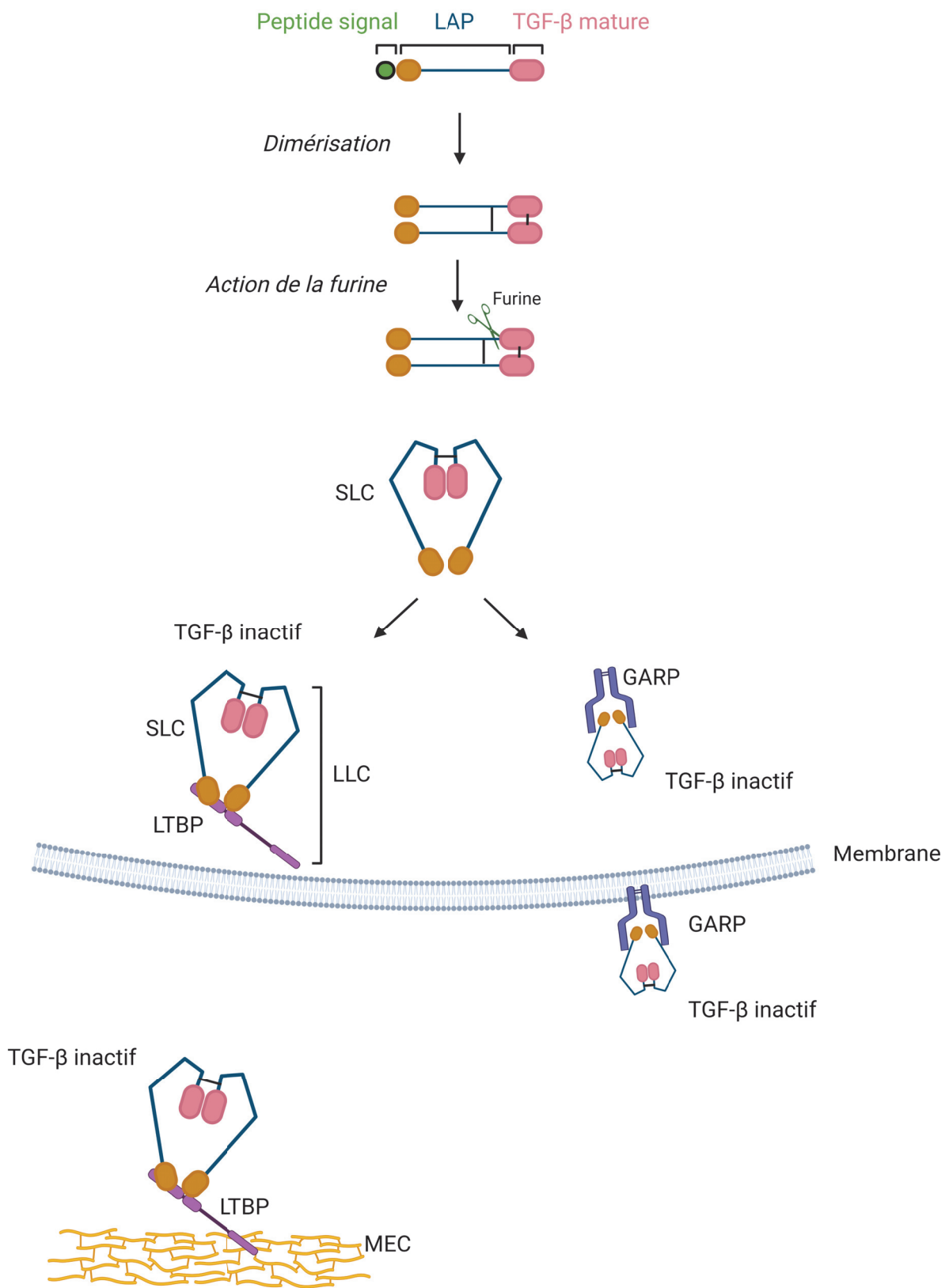


Figure 13 : Synthèse et sécrétion du TGF-β.

Le TGF- β est synthétisé sous forme de pré-pro-TGF- β avec un peptide signal, la région de latence LAP et la cytokine mature. Le peptide signal permet de diriger le pré-pro-TGF- β vers le réticulum endoplasmique où deux pré-pro-TGF- β via des ponts dissulfures vont se dimériser. La furine clive ensuite au niveau du LAP et du TGF- β permettant de dissimuler le site de fixation du TGF- β par un repliement du LAP autour du TGF- β rendant cette cytokine inactive. A ce stade, le TGF- β peut être sécrété sous cette forme mais peut également se lier au LTBP pour former le LLC permettant un meilleur stockage du TGF- β inactif dans la MEC. Le TGF- β peut également être associé à GARP et être sécrété sous cette forme permettant de maintenir du TGF- β inactif au niveau de la surface de la cellule exprimant GARP.

LAP : peptide associé à la forme latente, SLC : complexe latent court, LTBP : protéine fixant le TGF- β latent, LLC : complexe latent long, MEC : matrice extracellulaire, GARP : protéine avec une répétition prédominante de glycoprotéine A.

B Activation

In vitro et *in vivo*, différents mécanismes ou facteurs interviennent dans l'activation du TGF- β . Le TGF- β peut ainsi être activé par différents facteurs physico-chimiques tels que la chaleur, les détergents, l'acidité du pH < 2,5 (Lyons, Keski-Oja, et Moses 1988), les ROS (reactive oxygen species) (Barcellos-Hoff et al. 1994), les forces de cisaillement (Ahamed et al. 2008) ou encore les radiations ionisantes (Barcellos-Hoff et al. 1994). Cependant, la relevance *in vivo* de ces modes d'activation reste à démontrer.

In vivo, la thrombospondine-1 (TSP-1), protéine de la MEC, peut activer le TGF- β via sa séquence KRFK en reconnaissant au niveau du LAP une séquence spécifique (LSKL) ce qui permet la dissociation et la libération du TGF- β (Ribeiro et al. 1999).

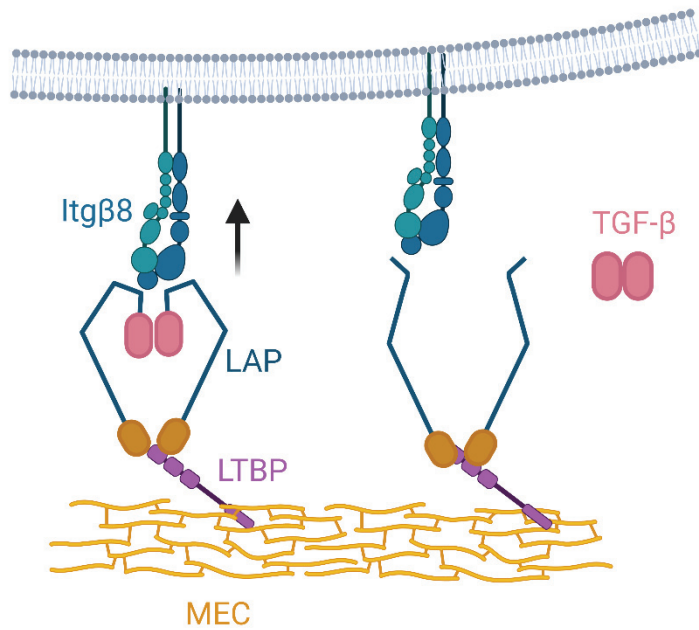
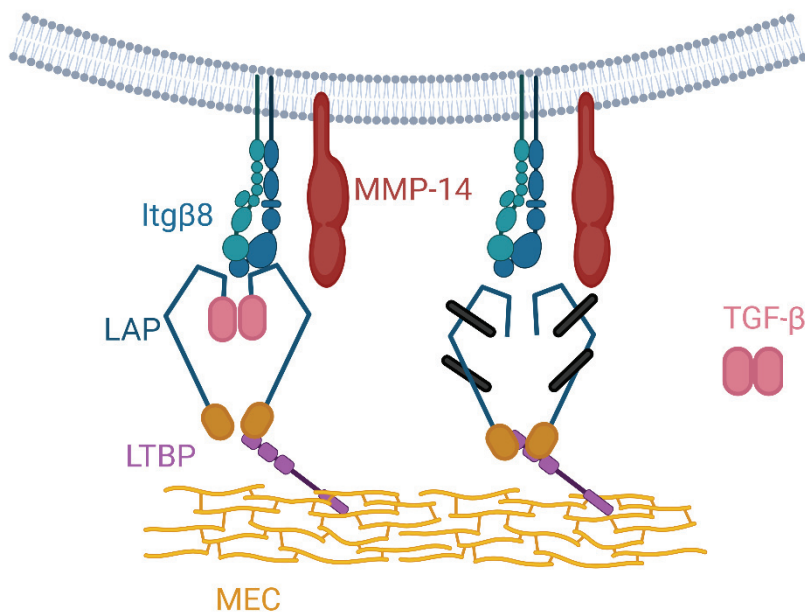
A**B**

Figure 14 : Activation du TGF- β inactif.

A) Le TGF- β inactif nécessite d'être activé afin de se fixer sur son récepteur. Son activation peut se faire via les intégrines, notamment la $\beta 6$ ou encore $\beta 8$. Ces intégrines reconnaissent au niveau du LAP une séquence RGD. Cette interaction entraîne une force de traction qui déforme physiquement le LAP et permet la libération du TGF- β . B) La reconnaissance du LAP

par les intégrines peut également permettre l'action de protéases qui dégradent le LAP et permettent la libération du TGF- β .

L'activation du TGF- β 1 est possible également grâce à des intégrines notamment les intégrines α v β 6 (itg β 6) et α v β 8 (itg β 8). Les intégrines sont des molécules hétérodimériques composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Il est dénombré 24 dimères d'intégrines dont l'association définit la spécificité pour son substrat. Ainsi, sont retrouvées des intégrines permettant la liaison au collagène, des intégrines leucocytaires et enfin des intégrines capables de reconnaître le motif RGD. Seules les intégrines itg β 6 et itg β 8 lient les séquences RGD du LAP *in vivo*. La sous-unité TGF- β 2 au niveau du LAP ne présente pas de motif RGD. Ainsi, les intégrines itg β 6 et itg β 8 reconnaissent la séquence RGD et libèrent la forme active du TGF- β 1 ou TGF- β 3 de son envasement dans le LAP via des forces de traction grâce à un remodelage du cytosquelette de la cellule porteuse de l'intégrine. L'itg β 6 est principalement exprimée par les cellules épithéliales et les souris déficientes pour cette intégrine développent des inflammations rénales et pulmonaires (B. Wang et al. 2007; Sugimoto et al. 2012) avec d'importants infiltrats inflammatoires au niveau de la peau et des poumons. L'itg β 8, quant à elle, est exprimée par un panel plus large de cellules telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules gliales mais également les cellules du système immunitaire (Travis et al. 2007). Une déficience de l'itg β 8 entraîne une mort embryonnaire chez certaines souris (Jiangwen Zhu et al. 2002). De plus, la délétion de l'itg β 8 dans les leucocytes ($Vav1^{Cre}itg\ \beta 8^{fl/fl}$) mène au développement d'une auto-immunité importante (Travis et al. 2007). Il a été mis en évidence que la délétion de l'itg β 8 au niveau des DCs induit une forme d'auto-immunité surtout intestinale (Travis et al. 2007). Les lymphocytes T surtout CD4 expriment fortement itg β 8, mais la délétion de l'itg β 8 dans les LTs ne participe pas au développement de l'auto-immunité (Travis et al. 2007). De plus, dans l'étude publiée par Lainé et al, il est montré que l'itg β 8 portée par les T régs permet le contrôle de la réponse cytotoxique T CD8 et que l'ablation au niveau des LTs régs de l'itg β 8 permet un meilleur contrôle de la croissance tumorale associée (Lainé, Labiad, Hernandez-vargas, et al. 2021).

Ces différentes observations suggèrent que l'activation du TGF- β qui protège de l'auto-immunité n'est pas restreinte à un type cellulaire. Parmi les lymphocytes T, les T régs activés expriment de fort niveau d'itg β 8. La délétion spécifique de l'itg β 8 dans les LTs régs n'entraîne

pas de maladies auto-immunes, mais la présence de l'itg $\beta 8$ est essentielle pour contrôler l'inflammation intestinale ou colique (Worthington et al. 2015a).

De plus, une étude très récente a montré que l'intégrine $\beta 8$ exprimée par les cellules immunitaires ou les cellules gliales est l'unique moyen d'activation de la sous-unité TGF- $\beta 1$ lorsque cette dernière se retrouve à la surface de la cellule couplée à LRRC33 (NRROS) comme il a pu être montré chez l'Homme par l'équipe de Zelin Duan (Duan et al. 2022).

La forme active du TGF- β a une demi-vie courte d'environ 2 à 3 minutes (Wakefield et al. 1990), cela implique une régulation fine afin de permettre l'interaction après activation avec son récepteur durant cette fenêtre de 2 à 3 minutes.

C Signalisation

Suite au passage de la forme latente à la forme active, le TGF- $\beta 1$ se fixe à son récepteur commun aux 3 isoformes. Le récepteur au TGF- β se compose de 2 sous-unités TGF- β R1 et TGF- β R2 et peut également contenir la sous-unité TGF- β R3 servant de récepteur accessoire améliorant l'affinité du TGF- β aux sous-unités TGF- β R1 et TGF- β R2 dans certains types de tumeurs (Cheifetz et al. 1992; Massagué et Chen 2000; Attisano et Wrana 2002; Velasco-Loyden, Arribas, et López-Casillas 2004). Les sous-unités TGF- β R1 et TGF- β R2 sont composées d'un ectodomaine glycosylé d'environ 100 acides aminés, une région transmembranaire, une courte séquence juxta-membranaire et un domaine kinase cytoplasmique (Chaikuad et Bullock 2016). Le TGF- β actif se lie au TGF- β R2 induisant l'assemblage d'un tétramère composé de deux TGF- β R2 et deux TGF- β R1. Le TGF- β R2 possède une affinité très importante pour le TGF- β dont la fixation permet l'autophosphorylation de son domaine kinase conduisant au recrutement de TGF- β R1, phosphorylé par la kinase du TGF- β R2 (Y. Shi et Massague 2003).

La phosphorylation de la sous-unité TGF- β R1 entraîne la phosphorylation des protéines SMAD2 et SMAD3 qui interagissent à leur tour avec SMAD4 ou TRIM33 (tripartite motif-containing 33) qui migrent dans le noyau conduisant à la voie canonique de la signalisation du TGF- β . Il existe également une autre voie de signalisation du TGF- β , la voie non canonique (Y. E. Zhang 2009) passant par la voie des MAPK (Papageorgis et al. 2011).

Parmi les gènes induits par la signalisation canonique, il y a celui codant pour SMAD7, une protéine qui, une fois induite, régule négativement la signalisation du TGF- β (Smads, Miyazawa, et Miyazono 2017) en entrant en compétition avec SMAD2/3 pour le TGF- β RI. SMAD7 possédant une affinité plus importante pour le récepteur induit également la déphosphorylation de TGF- β RI. En effet, au niveau du domaine GS, la fixation de FKBP12 associé à SMAD7 permet de bloquer l'activation de la sous-unité RI par la sous-unité RII (Huse et al. 2001). Egalement, le complexe GADD34-SMAD7 permet le recrutement de PP1c via SMAD7 pour déphosphoryler TGF- β RI (W. Shi et al. 2004).

D'autres moyens de régulation ont également pu être mis en évidence notamment par l'ubiquitination par SMURF2 de SMAD2 ou encore la dégradation de SMAD3 par un complexe protéique formé de SCF/Roc1 (Y. Zhang et al. 2001; Fukuchi et al. 2001). De plus, SMAD4 est dégradé via TRIM-33, SCF ou Jab1 (Wan et al. 2002; 2004; He et al. 2006). Enfin, une compétition via les protéines SKI ou encore Snow permet l'inhibition de la signalisation du TGF- β en interagissant avec pSMAD2/3 (phospho SMAD2/3) au détriment de SMAD4 (Deheuninck et Luo 2009).

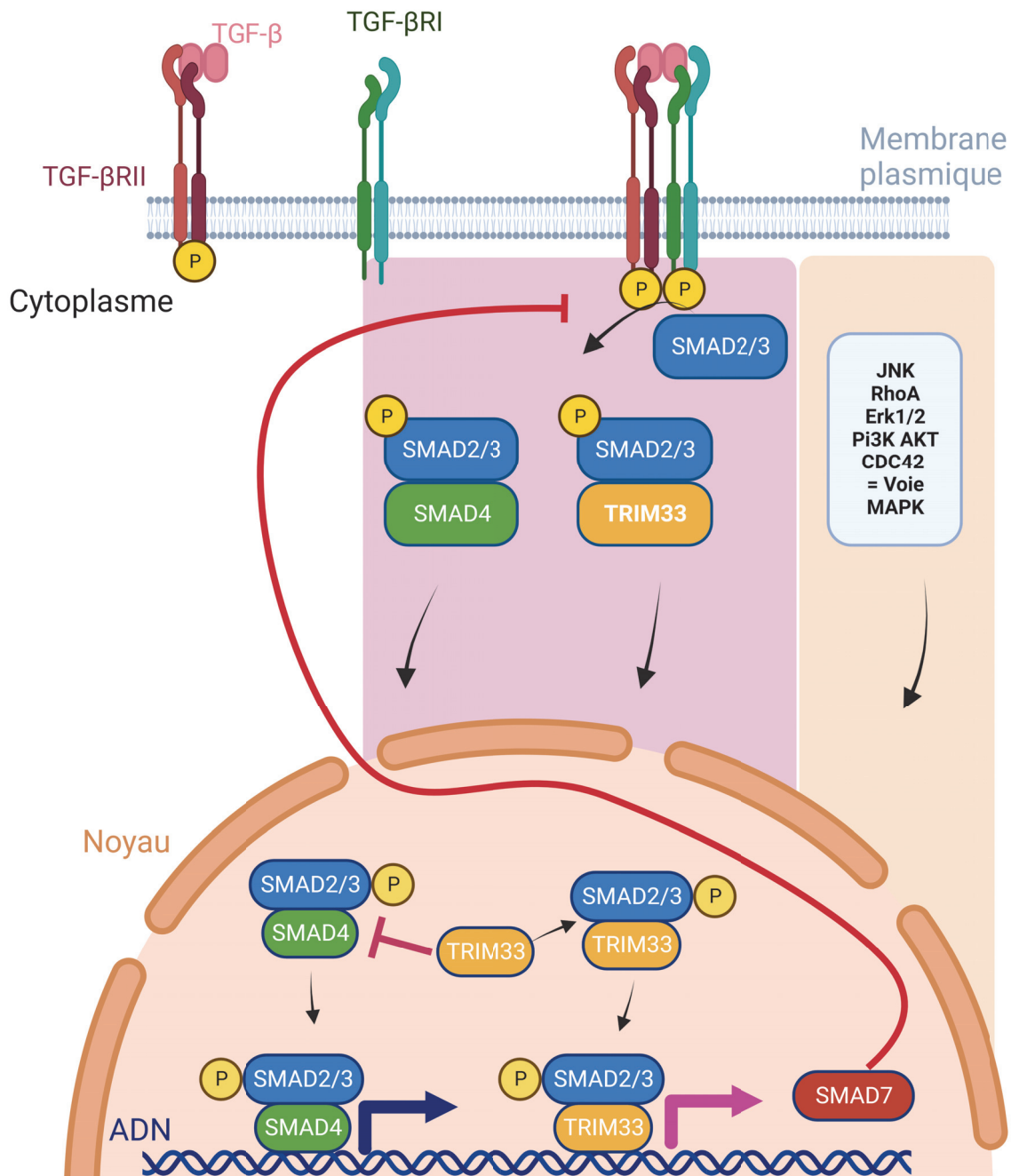


Figure 15 : La signalisation du TGF-β.

Dès que le TGF-β activé, il peut se lier à son récepteur. La sous-unité RII du récepteur possède l'affinité la plus forte et lie le TGF-β. Cela permet le recrutement de la sous-unité RI du récepteur. Cette dernière est la sous-unité permettant l'activation des voies canoniques (fond rose) et non canoniques (fond marron). La signalisation du TGF-β active l'expression de SMAD7 qui est un répresseur de la signalisation du TGF-β, cela permet le rétrocontrôle de la signalisation.

III- Action du TGF- β sur les LTs

Au sein du système immunitaire, la cible principale des effets régulateurs du TGF- β sont les lymphocytes T $\alpha\beta$. En effet, des souris CD4^{Cre} TGF- β RII^{fl/fl} développent, dès l'âge de trois semaines, une auto-immunité fatale qui touche tous les organes et en tout point comparable aux souris dont la production de TGF- β 1 est délétée (Marie, Liggitt, et Rudensky 2006a; Shull et al. 1992).

1) Action du TGF- β au niveau de la sélection thymique

L'action du TGF- β sur la biologie des lymphocytes s'exerce dès le développement thymique. En effet, des souris dépourvues de la signalisation du TGF- β au stade DP au niveau du thymus développent des maladies auto-immunes dirigées contre plusieurs organes entraînant la mort de ces souris 3 à 4 semaines après leur naissance (M. O. Li, Sanjabi, et Flavell 2006a; Marie, Liggitt, et Rudensky 2006a). Cependant, quand la signalisation du TGF- β est maintenue au cours des sélections thymiques mais délétée au niveau des T périphériques, aucune maladie auto-immune létale n'apparaît, présentant le TGF- β comme une cytokine jouant un rôle central lors du processus de sélection notamment lors de la sélection négative (N. Zhang et Bevan 2012; Mccarron et al. 2019). En plus de l'engagement du TCR lors de la différenciation au niveau du thymus, les LTs nécessitent la signalisation de l'IL-7 qui est promu par l'action du TGF- β induisant l'expression de la chaîne α de l'IL-7R. Cela permet une amélioration de la survie des LTs en devenir (J. Park et al. 2010; W. Ouyang et al. 2013). De plus, le TGF- β permet également la génération des LTs régulateurs (Yongzhong Liu et al. 2008), des iNKTs (Doisne et al. 2009) ou encore des LTs intra-épithéliaux (Maruyama et al. 2011).

Ainsi, le TGF- β contrôle l'homéostasie des cellules T en inhibant directement la prolifération et l'activation des cellules T. Il a pu être mis en évidence dans des souris déficientes en *Smad3* que les LTs étaient spontanément activés et qu'ils résistaient à l'inhibition induite par le TGF- β (McKarns, Schwartz, et Kaminski 2004; Yang et al. 1999).

2) Effet du TGF- β sur la différenciation des LTs

Le TGF- β a également un impact dans la différenciation des LTs matures après leur sortie du ganglion. La signalisation du TGF- β inhibe directement T-bet, un facteur de transcription nécessaire à la différenciation des LTs cytotoxiques (Thomas et Massagué 2005a; Mackay et al. 2015) induisant un défaut de différenciation des CD4 Th en Th1 (Gorelik, Constant, et Flavell 2002). Il inhibe également l'expression de Gata-3 impactant ainsi la différenciation des Th2 (Gorelik, Fields, et Flavell 2000). Cependant, le TGF- β n'agit pas uniquement en tant qu'inhibiteur dans la différenciation des LTs mais promeut la différenciation des LTrégs périphériques, des Tfhs (T follicular helper), des Th9 (en association avec l'IL-4) et des Th17. La signalisation du TGF- β en association à l'IL-2 a une action directe ou indirecte sur l'expression de FoxP3 ce qui permet la différenciation de LTs CD4 en pTregs (T régs périphériques) (W. Chen et al. 2003). De plus, il a pu être montré que le TGF- β en association avec l'IL-6 et l'IL-23 favorise la génération de Th17 en induisant l'expression de ROR γ T, facteur de transcription caractéristique des Th17 et, plus généralement, par les cellules productrices d'IL-17 (Bettelli et al. 2006; Veldhoen et al. 2006).

3) Effet du TGF- β sur la réponse effectrice

Parmi l'ensemble des mécanismes à disposition de la tumeur pour contrer le système immunitaire, la production ou l'activation du TGF- β est considérée comme l'un des mécanismes les plus efficaces (Wojtowicz-praga 2003). Cela a pu être démontré dans divers modèles de tumeurs chez la souris (Torre-amione et al. 1990; Won et al. 1999). Lorsqu'elles sont confrontées à des tumeurs produisant du TGF- β , les souris dont les cellules T ont été rendues résistantes au TGF- β par l'expression d'un transgène dominant négatif du récepteur au TGF- β sont capables de développer une réponse immunitaire efficace et d'éliminer la tumeur (Gorelik, Flavell, et Haven 2000; Gorelik et Flavell 2001a).

De même, les expériences de transfert adoptif démontrent que le compartiment T CD8 est le principal acteur du processus de contrôle et d'élimination de la tumeur, démontrant clairement que l'effet inhibiteur du TGF- β impacte principalement les LTs CD8 (Gorelik et Flavell 2001a). De plus, il a pu être démontré que cette clairance des cellules tumorales est due à un meilleur recrutement des CTLs au niveau la tumeur. En effet, le groupe de Gunderson a

montré qu'en utilisant un inhibiteur de TGF- β RI sur les CTLs, un rejet accru d'une lignée cancéreuse de côlon est observé et cela étant associé à une expression de CXCR3 plus importante (Gunderson et al. 2020).

Les CTLs activés, principaux responsables de la clairance spécifique de l'antigène des cellules tumorales, utilisent généralement deux grandes voies dépendantes du contact pour tuer les cellules cibles. La première est la voie de l'exocytose des granules cytotoxiques. Lorsqu'un CTL activé reconnaît une cellule tumorale, la protéine de formation de pores membranaires, la perforine, transmet à la cellule cible les protéases induisant l'apoptose, le granzyme A (GzA) et/ou le granzyme B (GzB) (Lieberman et Fan 2003; Trapani et Smyth 2002). Le deuxième mécanisme dépendant du contact, la voie Fas-Fas ligand (FasL), active la mort des cellules cibles par la libération de cytochrome c et l'activation des caspases (Russell et Ley 2002). De plus, des médiateurs solubles, dont le TNF- α et l'IFN- γ , sont sécrétés par les CTLs pour induire la cytotoxicité des cellules cibles. La signalisation du TGF- β implique sa liaison à un complexe de récepteurs sérine/thréonine kinases formé par les récepteurs de type I et II. Cette fixation est suivie de la phosphorylation de SMAD2 et SMAD3 (pSMAD2/3) médiée par le récepteur. Ainsi activés, SMAD2 et 3 se lient à SMAD4. Le complexe pSMAD2/3-SMAD4 s'associe à d'autres protéines de liaison à l'ADN formant ainsi différents complexes répresseurs ou activateurs de gènes cibles. De plus, SMAD2 et 3 activés s'associent également avec ATF-1 pour la régulation des molécules effectrices (Thomas et Massagué 2005a). En effet, au niveau des CD8 CTLs, il a pu être montré que la signalisation du TGF- β diminue et bloque l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la cytotoxicité telles que la perforine, le GzA, le GzB, FasL ou encore l'IFN- γ (Thomas et Massagué 2005a). Il a pu également être montré que les gènes codant pour le GzB et l'IFN- γ sont directement ciblés par la signalisation du TGF- β car ils sont reconnus par SMAD et ATF1 impliquant un effet inhibiteur direct induit par le TGF- β .

Le TGF- β réprime la prolifération des LTs CD8 induits par l'antigène (Johnson et Jameson 2012) via des mécanismes dépendants de DGK- ζ et PTPN22 (Arumugam et al. 2015; Brownlie et al. 2017). FOXP1 interagit avec SMAD 2 et 3 induits par la signalisation du TGF- β afin de réprimer les facteurs de transcription MYC et JUN responsables de la prolifération des LTs CD8 (Stephen et al. 2014). Comme expliqué précédemment, le TGF- β réprime l'activité de facteurs de transcription tels que T-bet et eomes nécessaires dans la différenciation en CTL.

La stimulation chronique des CTLs entraîne l'épuisement des LTs caractérisé par une forte expression de PD-1, état de dysfonctionnement qui rend les CTLs moins compétents à répondre contre les cellules cibles. Il a pu être montré par le groupe de Park au niveau de LTs spécifiques d'antigènes tumoraux que l'expression de PD-1 est corrélée à l'activité de la signalisation du TGF- β entraînant la présence de SMAD 3 au niveau de la région promotrice du gène *pdc1* (B. V Park et al. 2016).

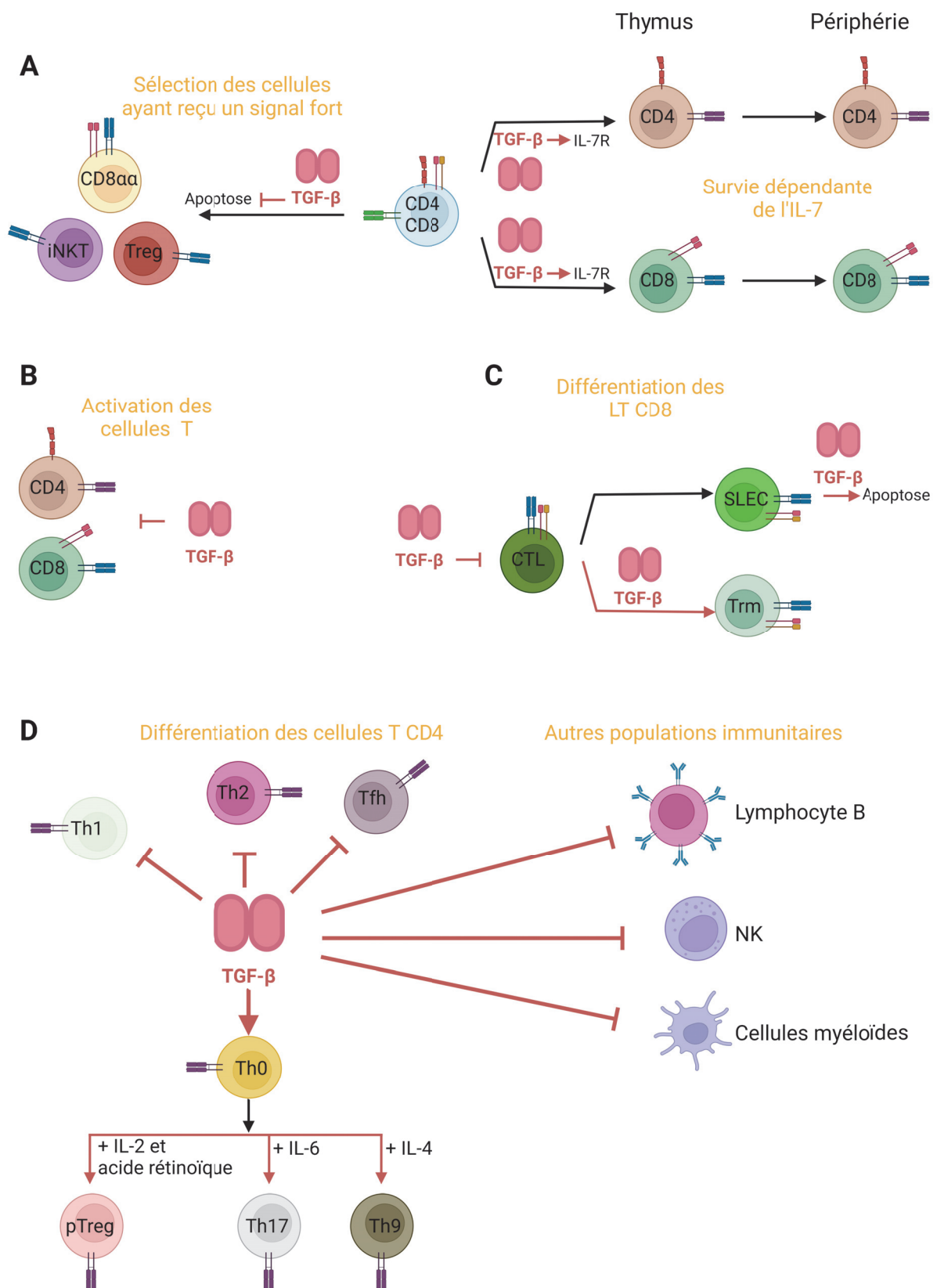


Figure 16 : Effet du TGF- β sur la réponse immunitaire.

A) Le TGF- β a une action au niveau du développement thymique des cellules T. Il soutient la survie des LTrégs produits, des cellules iNKTs et également des cellules CD8 $\alpha\alpha$. Le TGF- β permet également le développement des LTs CD8 en favorisant l'expression au niveau des thymocytes de l'IL-7R. B) Le TGF- β permet d'inhiber les cellules auto-réactives. C) Lors de la différenciation des LTs CD8, le TGF- β réprime le développement de l'activité cytotoxique, mais également entraîne l'apoptose des SLECs et peut favoriser la différenciation en LTs résidents mémoires. D) Le TGF- β intervient également dans la différenciation des LTs CD4 en inhibant la différenciation dans la voie Th1 ou encore Th2. Cependant, associé à d'autres facteurs, il peut favoriser le développement des LTs Th9, Th17 ou encore des LTrégs. Le TGF- β agit également sur d'autres populations immunitaires en inhibant l'action des lymphocytes B en bloquant leur expansion et diminuant la production des immunoglobulines. Le TGF- β agit sur les NKs en inhibant NKG2D, leur prolifération et leur programme cytotoxique. Le TGF- β agit également sur les cellules myéloïdes en inhibant leur prolifération et leur capacité de présentation de l'antigène. (Sanjabi, Oh, et Li 2017).

Objectifs de la thèse

L'immunothérapie tumorale est basée sur la capacité du système immunitaire à prévenir la transformation maligne et à éliminer efficacement les cellules cancéreuses. Cependant, le micro-environnement mis en place par les tumeurs solides leur permet d'échapper au système immunitaire en limitant la réponse anti-tumorale efficace. Ainsi, le TGF- β , cytokine possédant un puissant effet immunosuppresseur, est retrouvé au sein du MET. Parmi les trois isoformes du TGF- β (1-3), le TGF- β 1 est le plus répandu dans les tumeurs et est connu pour son effet sur le système immunitaire. Il altère de nombreuses fonctions des LTs effecteurs et favorise le développement et la stabilité des LTs régs. Le ciblage sélectif de la signalisation du TGF- β a conduit à une élimination des cellules cancéreuses par les LTs effecteurs.

Ainsi, la neutralisation des effets immuno-modulateurs du TGF- β a été considérée comme une thérapie anti-cancéreuse prometteuse. Cependant, des problèmes majeurs ont été soulevés dont le risque de déclencher une auto-immunité massive, compte tenu de l'impact du TGF- β dans la répression de l'activation des LTs en périphérie.

Comprendre les mécanismes d'action du TGF- β actif sur les LTs CD8 intra-tumoraux est important. Au vu de la place centrale du TGF- β dans le maintien de la tolérance périphérique par la répression de l'activation ou encore au niveau de l'engagement TCR, nous avons émis l'hypothèse que le TGF- β pourrait impacter la voie de signalisation du TCR au sein de la tumeur rendant la réponse des LTs CD8 plus compliquée contre les antigènes tumoraux de faible affinité.

Le but de mon travail de thèse a donc été double. Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre comment le TGF- β est activé au sein de la tumeur et, dans un second temps, à définir les conséquences du signal du TGF- β sur les LTs CD8 intra-tumoraux.

Pour ce faire :

- 1) Premièrement, nous avons cherché à déterminer quelles étaient les cellules capables d'activer le TGF- β (par l'expression de l'itg β 8) au sein de la tumeur.
- 2) Puis, nous avons, à l'aide d'un système Cre Lox, cherché à déterminer le rôle de l'itg β 8 portée par les LTs régs dans l'activation du TGF- β et les conséquences sur la réponse cytotoxique.
- 3) Enfin, nous avons cherché à déterminer les effets du TGF- β dans la réponse aux antigènes tumoraux de faible affinité.

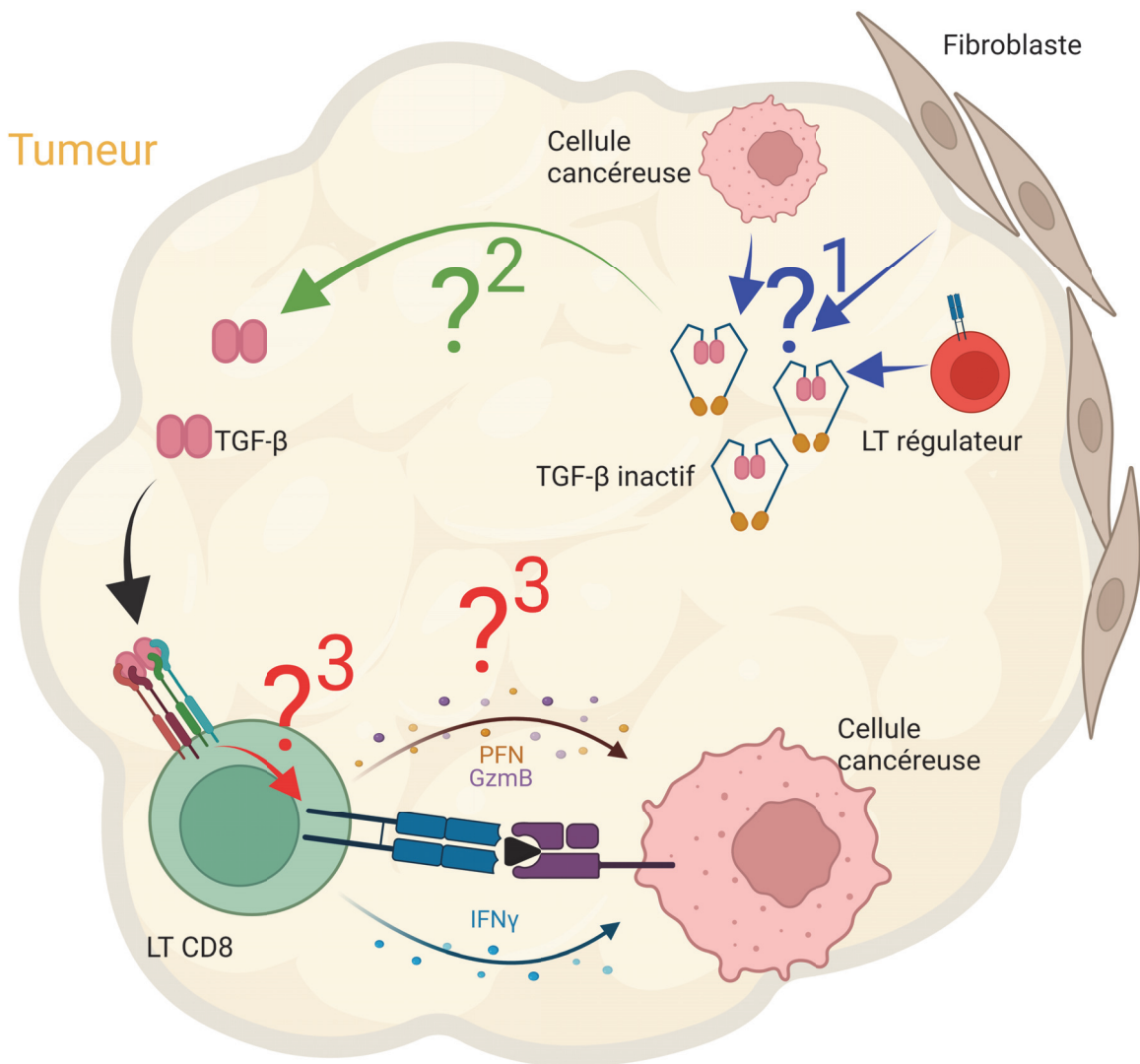


Figure 17 : Schéma récapitulatif des objectifs principaux de la thèse

Au sein de la tumeur il est retrouvé une grande quantité de TGF- β qui est une cytokine inhibant la réponse immunitaire. Nous avons donc cherché à déterminer l'acteur responsable de la production de cette cytokine au sein du microenvironnement tumoral (1). Puis nous avons cherché à déterminer le mécanisme d'activation au sein de la tumeur (2). Enfin nous avons cherché à déterminer l'effet du TGF- β sur la réponse cytotoxique des LTs CD8 de manière globale et plus particulièrement lors de leur réponse contre des antigènes tumoraux d'affinité différente.

RESULTATS

Article 1 : Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin $\alpha\beta 8$ -mediated TGF- β activation

Résumé du premier article :

La présence de TGF- β dans le micro-environnement tumoral est l'un des mécanismes d'immuno-évasion du cancer les plus pertinents. Le TGF- β est sécrété sous une forme inactive et son activation au sein de la tumeur peut dépendre de types de cellules et de mécanismes différents de ceux de sa production. Nous montrons ici dans des modèles murins de mélanome et de cancer du sein que les cellules T régulatrices (Treg) exprimant la chaîne $\beta 8$ de l'intégrine $\alpha\beta 8$ (Itg $\beta 8$) sont le principal type cellulaire dans les tumeurs qui active le TGF- β produit par les cellules cancéreuses et stocké dans le micro-environnement tumoral. L'ablation d'Itg $\beta 8$ dans les cellules Treg altère la signalisation du TGF- β dans les lymphocytes T intra-tumoraux mais pas dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur. Successivement, la fonction effectrice des lymphocytes T CD8+ infiltrant la tumeur se renforce, conduisant à un contrôle efficace de la croissance tumorale. Chez les patients atteints de cancers, le traitement par anticorps anti-Itg $\beta 8$ suscite une amélioration similaire de l'activation des cellules T cytotoxiques. Ainsi, cette étude révèle que les cellules Treg travaillent de concert avec les cellules cancéreuses pour produire du TGF- β bioactif et créer un micro-environnement immunosuppresseur.

Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ -mediated TGF- β activation

Alexandra Lainé¹, Ossama Labiad¹, Hector Hernandez-Vargas¹, Sébastien This², Amélien Sanlaville¹, Sophie Léon³, Stéphane Dalle^{1,4}, Dean Sheppard⁵, Mark A. Travis^{6,7,8}, Helena Paidassi² & Julien C. Marie¹✉

Presence of TGF β in the tumor microenvironment is one of the most relevant cancer immune-escape mechanisms. TGF β is secreted in an inactive form, and its activation within the tumor may depend on different cell types and mechanisms than its production. Here we show in mouse melanoma and breast cancer models that regulatory T (Treg) cells expressing the β8 chain of $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ integrin (Itg β8) are the main cell type in the tumors that activates TGF β , produced by the cancer cells and stored in the tumor micro-environment. Itg β8 ablation in Treg cells impairs TGF β signalling in intra-tumoral T lymphocytes but not in the tumor draining lymph nodes. Successively, the effector function of tumor infiltrating CD8⁺ T lymphocytes strengthens, leading to efficient control of tumor growth. In cancer patients, anti-Itg β8 antibody treatment elicits similar improved cytotoxic T cell activation. Thus, this study reveals that Treg cells work in concert with cancer cells to produce bioactive-TGF β and to create an immunosuppressive micro-environment.

¹Tumor Escape Resistance and Immunity department, Cancer Research Center of Lyon INSERM U1052, CNRS UMR 5286, Centre Léon Bérard, Claude Bernard Université Lyon 1, 69373 Lyon, France. ²CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, INSERM U1117, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, 69007 Lyon, France. ³Plateforme Ex-Vivo, Département de Recherche Translationnelle et d'Innovation, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ⁴Department of Dermatology, Claude Bernard Université Lyon 1, Centre Hospitalier Lyon Sud, 69495 Pierre Bénite, France. ⁵University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA. ⁶Lydia Becker Institute of Immunology and Inflammation, University of Manchester, Manchester, UK. ⁷Wellcome Centre for Cell-Matrix Research, University of Manchester, Manchester, UK. ⁸Faculty of Biology, Medicine and Health, Manchester Academic Health Sciences Centre, University of Manchester, Manchester, UK. ✉email: julien.marie@inserm.fr

The tenet of tumor immunotherapy is based on the ability of the immune system to survey for malignant transformation and be efficient at eliminating cancer cells. However, solid tumors can escape from the immune system by orchestrating a microenvironment that limits an efficient anti-tumor immune response.

In the tumor microenvironment (TME), transforming growth factor beta (TGF- β) is regarded as a key cytokine-promoting potent immunosuppression⁴. Among the three isoforms of TGF- β (TGF- β 1–3), TGF- β 1 is prevalent within tumors^{2,3}. This polypeptide cytokine, highly conserved in all mammals⁴, impairs numerous functions of effector T lymphocytes and promotes both development and stability of CD4^{pos} Foxp3^{pos} regulatory T cells (Tregs)^{5,6}. Subsequently, the selective targeting of TGF- β signaling in T lymphocytes leads to an efficient elimination of cancer cells by effector T lymphocytes⁷ repressing their cytotoxic functions⁸. Hence, neutralization of TGF- β immunoregulatory effects has been thought of as a promising anticancer therapy. However, major safety issues were raised, one of which being the risk of unleashing massive autoimmunity, given the key role of TGF- β signaling in the repression of T-lymphocytes activation^{5,6,9,10}.

Importantly, TGF- β is one of the few cytokines secreted in an inactive form. This small latency complex is composed of the mature cytokine encircled by the latency-associated peptide (LAP), which are noncovalently associated. LAP covers all the contact sites of the mature cytokine that must interact with TGF- β receptor complexes (TGF β RI and TGF β RII) to induce TGF- β signaling, including the phosphorylation of SMAD2/3¹¹. Within solid tumors, the latent TGF- β complex can be secreted by several cell types, including cancer cells, and Tregs¹. Nevertheless, unlike the TGF- β produced by Tregs, TGF- β secreted by cancer cells seems essential for the repression of the anti-tumor immune response^{12,13}. As long as LAP maintains close contact with the mature cytokine, the secreted latent TGF- β can be stored in the TME, attached to the extracellular matrix, without any immune-regulatory functionality¹¹. Hence, activation of the secreted TGF- β latent complex, which involves exposure of the receptor-binding domain of the mature cytokine, is therefore indispensable for TGF- β -mediated immunoregulatory functions in tumors. Thus, deciphering the mechanisms by which the activation of TGF- β present in the TME occurs is essential to our comprehension of solid tumors escape the immune system and will highlight potential new effective anticancer therapies that specifically target TGF- β activation within the TME and thus limiting autoimmune side effects associated to the privation of TGF- β activation. In vivo, the activation of TGF- β 1 is largely dependent on integrins, including the α v β 8 integrin, whose expression is regulated by that of the β 8 subunit (Itg β 8)^{14,15}.

In this work, we demonstrate that the expression of the integrin α v β 8 in Tregs is essential to efficiently activate TGF- β produced by cancer cells and promote tumor immune escape. In the absence of expression of the β 8 integrin chain (Itg β 8) in Tregs, TGF- β signaling is impaired in tumor-infiltrating effector T cells and their cytotoxic functions are unleashed leading to the efficient control of tumor growth. In patient tumors, treatment with a neutralizing anti-Itg β 8 antibody, as well as single-cell gene-expression analysis on tumor-infiltrating T cells, confirmed the relevance of our findings in mice to human pathology. Overall, our results reveal an unexpected collaboration between cancer cells and Tregs to create an efficient TGF- β -mediated immunosuppressive TME, highlighting that the targeting of Itg β 8 might constitute efficient immunotherapy.

Results

Itg β 8 is mainly expressed in regulatory T cells in tumors. In order to understand the mechanisms leading to the activation of

the latent complex in the tumor, we first analyzed Itg β 8 cellular expression in the TME. To monitor Itg β 8 by flow cytometry, we took an unbiased approach by generating an *Itg β 8-td-Tomato* reporter mice, in which we previously validated that tdTomato-positive cells expressed Itg β 8 protein in different cell types, including T lymphocytes¹⁶. Flow cytometry analysis of tumors (melanoma and breast cancer) revealed that among host cells composing the TME, Itg β 8^{pos} cells were mainly (85–95%) CD45^{pos} hematopoietic cells (Fig. 1a, b). T lymphocytes (CD3^{pos}), and particularly the CD4^{pos} Foxp3^{pos} (Treg) subset, composed the main portion of hematopoietic cells expressing Itg β 8, with approximately 80% of Itg β 8^{pos} CD45^{pos} cells being CD4^{pos} Foxp3^{pos} irrelevant of the tumor type (Fig. 1c–f). Moreover, within the Treg compartment, we found that about 40–45% of cells expressed Itg β 8 (Fig. 1g, h) and only Itg β 8^{pos} Tregs were endowed with the capacity to efficiently activate TGF- β 1 (Fig. 1i) whereas both Itg β 8^{pos} Treg and Itg β 8^{neg} Treg populations expressed similar levels of this cytokine (Fig. 1j). Thus, this first set of data reveals that Tregs constitute a large part of the Itg β 8-expressing host cells within the TME.

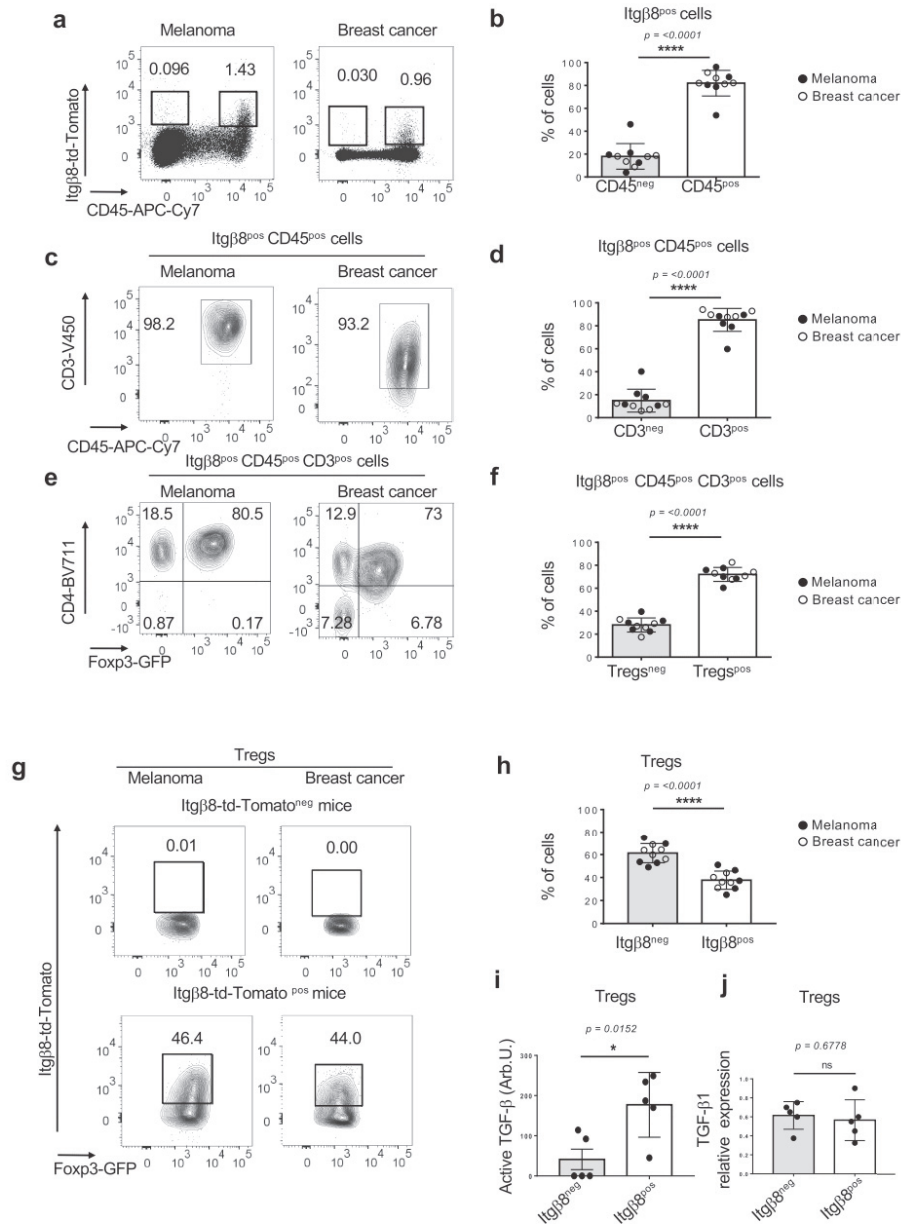
Itg β 8 expression in Tregs impairs anti-tumor response and promotes tumor growth.

Next, in order to assess whether Itg β 8 expression by Tregs confers their abilities to control the anti-tumor immune responses by providing a bioactive source of TGF- β , we first selectively ablated *Itg β 8* in Tregs, using *Foxp3-Cre Itg β 8^{fl/fl}* mice (Foxp3 Δ Itg β 8). Importantly, in Foxp3 Δ Itg β 8 mice, Tregs retain their numbers, localization, as well as their suppressive functions, including the ability to produce TGF- β 1. Moreover, no autoimmunity signs, neither uncontrolled effector T-cell activation have been observed in Foxp3 Δ Itg β 8 animals^{17,18}.

Strikingly, in contrast to their littermate controls (Foxp3^{Ctrl}), Foxp3 Δ Itg β 8 mice showed a profound impairment of tumor growth irrelevant of the tumor type (Fig. 2a–f). Notably, we observed that 25–50% of the Foxp3 Δ Itg β 8 animals exhibited a complete control of the tumor progression depending on the tumor type (Table 1). Thus, Itg β 8 expression in Tregs promoted tumor growth, implying that the Itg β 8^{pos} Treg population could affect the anti-tumor function of the effector cells, including T cells and natural killer (NK) cells.

To confirm this scenario, we next analyzed the immune compartment of tumors and that of their draining lymph nodes (tdLN). Interestingly, the proportion of NK cells and T cells, including Tregs, were similar in both TME and tdLN between Foxp3 Δ Itg β 8 mice and Foxp3^{Ctrl} animals (Supplementary Fig. 1A). In line with this observation, the proliferative status of T cells and NK cells was similar between Foxp3 Δ Itg β 8 mice control animals in both tdLN and TME (Supplementary Fig. 1B). Thus, we ruled out a specific role of the Itg β 8^{pos} Tregs in controlling proliferation, recruiting of effector immune cells into the TME as well as T-cell priming in tdLN. However, the inhibition of tumor growth observed in Foxp3 Δ Itg β 8 mice was completely lost when animals were depleted of their CD8^{pos} T lymphocytes (Fig. 3a, b), revealing CD8 T cells as the main effector cells in the control of tumor growth in Foxp3 Δ Itg β 8 mice.

Thus, altogether these observations suggested that Itg β 8^{pos} Tregs exert their pro-tumoral effects by impairing the anti-tumor functions of CD8^{pos} T lymphocytes. In agreement with this assumption, we observed that CD8^{pos} T lymphocytes of the TME of Foxp3 Δ Itg β 8 mice exhibited higher cytotoxic functions based on the production of granzyme B cytotoxic granules (GzB) in association with the surface expression of CD107 (Lamp1) compared to Foxp3^{Ctrl} animals (Fig. 3c). Production of IFN- γ was also exacerbated in tumor infiltrating in both CD4^{pos} T cells and CD8^{pos} T cells from Foxp3 Δ Itg β 8 mice compared to Foxp3^{Ctrl}



animals (Supplementary Fig. 2), implying that in addition of GzB production and the cytotoxic granule release, the exacerbated production of IFN- γ by T cells could also contribute to the tumor growth control in Foxp3 Δ Itg β 8 mice.

Supporting the exacerbated cytotoxic features of CD8^{pos} T lymphocytes in the TME of Foxp3 Δ Itg β 8 mice, as well as the control of tumor growth in these animals, histology analysis

showed higher numbers of apoptotic cells in tumors from Foxp3 Δ Itg β 8 mice than control animals (Fig. 3d, e). Importantly, in clear contrast to the TME, we failed to find any exacerbation of the cytotoxic phenotype of CD8^{pos} T cells in the tDLN of Foxp3 Δ Itg β 8 mice (Fig. 3f). This observation, combined with the absence of systemic T-effector cell activation in secondary lymphoid organs of in Foxp3 Δ Itg β 8 mice^{17,18}, reveals a specific

Fig. 1 Tregs compose the main cells expressing Itgb8 in tumors. *Itgb8-td-Tomato* reporter mice were injected with melanoma cells (B16) or breast cancer cells (E0771) in the dermis or in the mammary gland respectively. Eighteen days later tumors were analyzed by flow cytometry. Percentages of the gated populations are mentioned on dot plots and counterplots. **a** Representative plots illustrate the *Itgb8-tdTomato* expression in tumors. **b** Histograms demonstrating the percentages of $Itgb8^{pos}$ cells among the hematopoietic compartment ($CD45^{pos}$) and the nonhematopoietic compartment ($CD45^{neg}$) in five tumors of each. **c, e** Representative contour plots illustrating the proportion of $CD3^{pos}$ cells among *Itgb8-tdTomato*^{pos} $CD45^{pos}$ cells and $CD4^{pos}$ $Foxp3^{pos}$ (Tregs) among *Itgb8-tdTomato*^{pos} T cells. **d-f** Histograms represent the average percentage of T cells among the *Itgb8-tdTomato*^{pos} $CD45^{pos}$ cells and the percentage Tregs among the *Itgb8-tdTomato*^{pos} T cells in five tumors of each. **g** Representative contour plots illustrating the *Itgb8-tdTomato* expression in $Foxp3^{pos}$ $CD4^{pos}$ T cells. **h** Histograms illustrate the average percentage of Tregs expressing *Itgb8-tdTomato* from five tumors of each. **i, j** *Itgb8-tdTomato*^{pos} Tregs and *Itgb8-tdTomato*^{neg} Tregs were FACS-sorted, and their ability to activate TGF- β using TGF- β signaling reporter cells was measured (**i**), as well as their ability to express *Tgfb1* by RT-qPCR. Graphs illustrate the levels of bio-activated TGF- β expressed in arbitrary unit (Arb.U.) (**i**), as well as the levels of expression *Tgfb1*mRNA normalized on *Gadph*. Error bar, mean \pm SD. **b, d, f, h** are representative of two experiments with five mice injected with each type of tumors per groups Data in (**i, j**) are representative of two experiments with five animals in total, each mouse providing both types of cells. * $P < 0.05$ paired two-tailed Student's *t* test. ns statistically not significant. **** $P < 0.0001$ were determined by unpaired two-tailed Student *t* test. Source data are provided as a Source Data file.

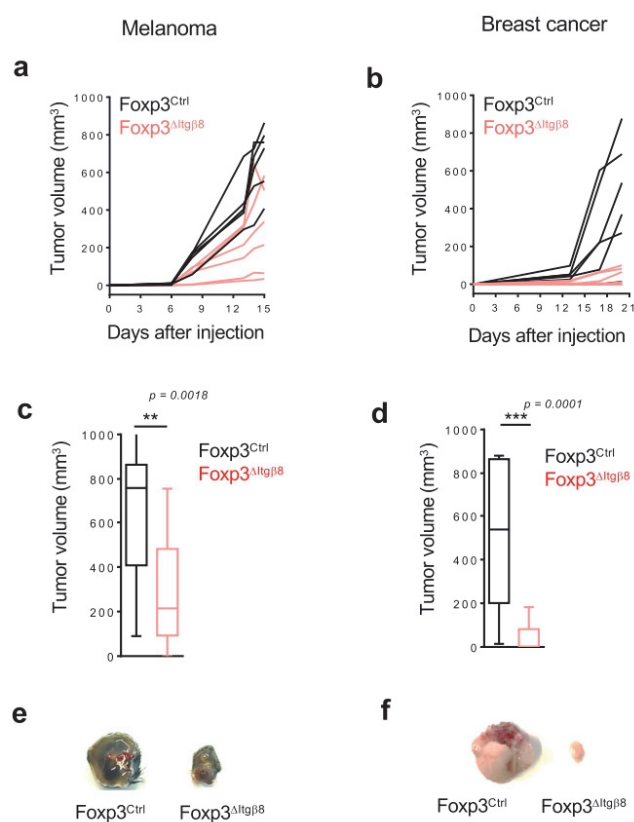


Fig. 2 Itgb8 expression on Tregs promotes tumor growth. $Foxp3^{\Delta Itg\beta 8}$ mice in red and their littermate controls in black ($Foxp3^{Ctrl}$) were injected either i.d. with melanoma (B16 cells) or in the mammary gland with breast cancer (E0771 cells). **a, b** Representative graphs illustrating the size of the tumors at different days post-injection. $n = 5-8$ mice per group. Data representative of two independent experiments. **c, d** Graphs demonstrate the tumor size (mean \pm SD), at the day of the euthanasia (18 days after injections) of the two independent experiments with a total of 16 mice per group. **c** $P = 0.0018$, **d** $P = 0.0001$. *** $P < 0.001$ and ** $P < 0.01$ were determined by unpaired two-tailed Student *t* test. **e, f** Representative pictures of tumors at the end of the experiments. Source data are provided as a Source Data file.

Table 1 Absence of Itgβ8 on Tregs represses tumor growth.

Genotype	Melanoma		Breast cancer	
	Foxp3 ^{Ctrl}	Foxp3 ^{ΔItgβ8}	Foxp3 ^{Ctrl}	Foxp3 ^{ΔItgβ8}
Number of mice	16	16	16	16
Number of mice with non-measurable tumor	0	4	1	8
Percentage of mice with non-measurable tumor	(0%)	(25%)	(6.25%)	(50%)

Foxp3^{ΔItgβ8} mice and their littermate controls (Foxp3^{Ctrl}) were injected either i.d. with melanoma (B16 cells) or in the mammary gland with breast cancer (E0771 cells). Table showing the percentage of Foxp3^{ΔItgβ8} mice and Foxp3^{WT} mice with a completed control of tumor growth (tumor < 100 mm³ all along the experiments) for both melanoma and breast cancer 18 days after implantation.

role for Itgβ8^{pos} Tregs in the repression of the cytotoxic functions of CD8^{pos} T lymphocytes selectively in the TME.

Altogether, these data identify Itgβ8 as a key mediator of Treg-induced suppression of the anti-tumor cytotoxic function of CD8^{pos} T cells present in the TME with direct consequences on tumor progression.

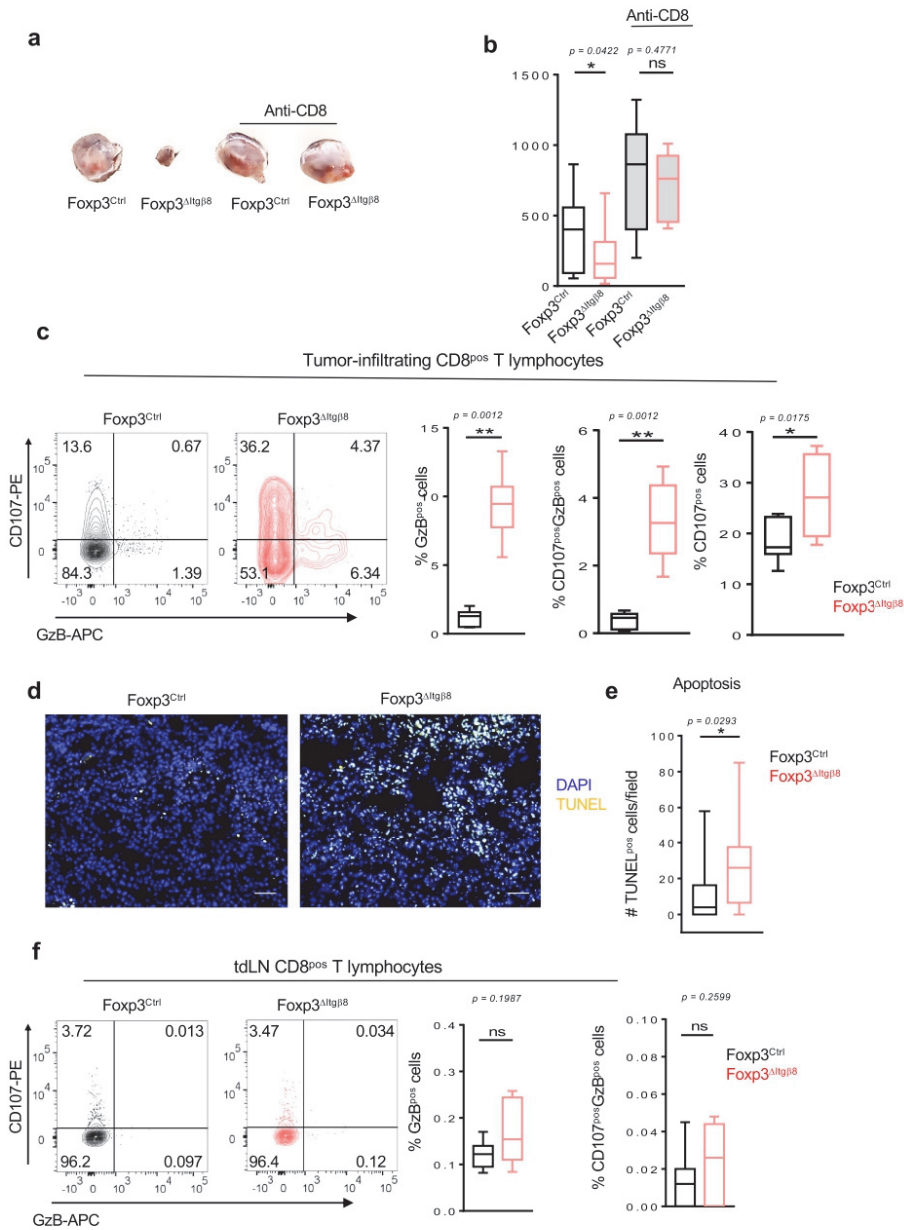
Itgβ8 expression on Tregs promotes TGF-β signaling controlling effector tumor T cells. Given the role of αvβ8 in TGF-β activation¹¹, and the unique ability of the Itgβ8^{pos} Treg subset to activate TGF-β1 compared to Itgβ8^{neg} Tregs (Fig. 1i), we next assessed whether the repression of CD8^{pos} T-cell cytotoxic functions in the TME of Foxp3^{ΔItgβ8} mice was due to an increase of the TGF-β signaling in the effector cells in the tumor. This assumption was even more motivated by the fact that, we found that the percentage of T cells with high activation of TGF-β signaling pathway, monitored by the phosphorylation of SMAD2-3, was halved in the TME of Foxp3^{ΔItgβ8} mice compared to Foxp3^{Ctrl} animals (Fig. 4a). Notably, in contrast to the TME, and in line with the absence of T-cell overactivation in tdLN of Foxp3^{ΔItgβ8} mice the levels of phosphorylation of SMAD2-3 in T lymphocytes from tdLN were similar between Foxp3^{ΔItgβ8} mice and Foxp3^{Ctrl} animals (Fig. 4b). Hence, Itgβ8^{pos} Tregs are responsible for the increase of TGF-β signaling in T cells present in the TME.

In order to confirm that the exacerbated cytotoxic features of CD8^{pos} T cells in the TME of Foxp3^{ΔItgβ8} mice were directly linked to the increase TGF-β signaling in effector T cells by Itgβ8^{pos} Tregs, we developed genetic approaches allowing to sustain high levels of TGF-β signaling activation in effector T cells. The T-cell compartment of CD3ε deficient mice was reconstituted with purified Tregs from either Foxp3^{Ctrl} mice or Foxp3^{ΔItgβ8} mice and Foxp3^{neg} T cells expressing either a constitutively active (CA) form (TGFβRI^{CA}) or the unmodified form of TGFβRI (TGFβRI^{WT})¹⁹ (Fig. 4c). In TGFβRI^{CA}-expressing T cells, the TGF-β signaling pathway remains activated even in the absence of bioactive source of TGF-β in their microenvironment as we previously described it^{19,20}. Similarly to the data illustrated in Fig. 3c, we observed that the absence of Itgβ8 expression in Tregs (Treg^{ΔItgβ8}) increased the cytotoxic features of transferred wild-type CD8^{pos} T cells. In contrast, in line with the ability of TGF-β to control GzB and CD107 expression⁸, the maintenance of TGF-β signaling in effector T cells was sufficient to completely prevent the overactivation of their cytotoxic program as well as the repression of tumor growth we routinely observed in the absence of Itgβ8 expression on Tregs (Fig. 4d–g). Thus, within the TME, Itgβ8 expression on Tregs

increases the levels of TGF-β signaling activation in effector T lymphocytes which is sufficient to repress their cytotoxic functions.

Activation of cancer cell-produced TGF-β1 by Itgβ8^{pos} Tregs leads to tumor CD8 T-cell loss of function. The aforementioned data, combined with the inability of Itgβ8 expression to modulate Tgf-β1 expression in Tregs (Fig. 1i) and the minor role of TGF-β1 produced by Tregs in the control of the effector T-cell functions in the TME¹², strongly suggest that Itgβ8^{pos} Tregs could contribute to the activation of TGF-β1 produced by other cells of the TME. As LAP reflects the inactive form of TGF-β, we evaluated the presence of LAP within the TME either in the presence or in the absence of Itgβ8 in Tregs. Strikingly, the classic fibrillar staining of the large latent complex was 2–3 times increased in the TME of Foxp3^{ΔItgβ8} mice compared to Foxp3^{Ctrl} animals (Fig. 5a, b), without overexpression of TGF-β1 in TME of Foxp3^{ΔItgβ8} mice (Fig. 5c) revealing more inactive form of TGF-β1 were stored in the TME of these animals. In order to address, the source of inactive TGF-β1 which accumulate in the TME of Foxp3^{ΔItgβ8} mice, we selectively ablated *tgf-β1* in cancer cells regarded as high producer cells of TGF-β1 (TGF-β1^{KO}) in the TME^{2,3} (Supplementary Fig. 3A). The accumulation of inactive form of TGF-β1 was lost in the TME of TGF-β1^{KO} cancer cells (Fig. 5d, e). Of note, the absence of TGF-β1 production by cancer cells strongly impaired the tumor growth in wild-type mice but not in T-cell-deficient animals (CD3^{KO}) (Supplementary Fig. 3B, C). Confirming the importance of TGF-β1 produced by cancer cells in the control of T-cell anti-tumor immune response, the phenotypical analysis of CD8 T cells from the TME of TGF-β1^{KO} cancer cells showed at 2–3 times exacerbation of their cytotoxic markers than in TME of TGF-β1 sufficient cancer cells (Fig. 5f, g). Importantly, the production of TGF-β1 by cancer cells had no significant impact Treg homeostasis (Supplementary Fig. 3D) and T-cell activation in the tdLN (Supplementary Fig. 3E, F). Thus, Itgβ8 expression by Tregs contributes to the activation TGF-β1 produced by cancer cells in the TME, with direct consequences on the repression the cytotoxic functions of CD8^{pos} T cells present in the TME and thus on tumor immune escape.

Itgβ8 expression on tumor-infiltrating T cells is associated with poor patient survival and CD8 T-cell activation. We next analyzed the relevance of our data in mice to human pathology, particularly in melanoma patients. First, we confirmed that human T cells expressed *ITGB8* in the TME by analyzing single-cell mRNAseq, and reported that *ITGB8* expression was prevalent in the Foxp3^{pos} compartment of the TME of various tumor types, with 65–70% of Itgβ8^{pos} T cells being Foxp3^{pos} T cells (Supplementary Fig. 4). We then made use of publicly available sets of single-cell sequencing analysis data and obtained a specific gene-expression signature of Itgβ8^{pos} T cells infiltrating the tumors, allowing us to perform multivariable survival analysis. We analyzed 358 patients bearing melanoma and revealed that high *ITGB8* score in tumor-infiltrating T cells was associated with poor survival (Fig. 6a). Of note, the poor survival prognostic associated with the presence of Itb8 Tregs was confirmed in other tumor types, except in colorectal cancer (Supplementary Fig. 5). The better survival prognostic observed in colorectal patients with high *ITGB8* score in Tregs from the TME was in agreement with the ability of Itgβ8^{pos} Tregs to repress established chronic intestinal inflammation in mice¹⁸ which was largely depicted to promote colorectal cancer progression²¹. Interestingly, our analysis confirmed that *FOXP3* expression alone in the T cells of TME was not sufficient to predict patient prognosis in any tumor types as previously showed²² (Supplementary Fig. 5). Of note,



given that *ITGB8* expression was reported to be increased on activated human Tregs¹⁸, we also removed the gene signature of activated Tregs in the *ITGB8* Treg signature and obtained similar survival prognostics as with the *ITGB8* Treg total gene signature for all the tumor types we analyzed (Supplementary Fig. 5). In line with poor survival associated with the presence of Itgβ8 Tregs in the TME of patients, we observed that the expression of *ITGB8*

Treg signature in the TME was inversely correlated with the activation of CD8 T cells present in the same TME (Fig. 6b). Thus, these data suggest that *ITGB8* expression in Tregs present in the TME might be useful as a predictor of poor patient survival and activation of CD8 T cells in tumors. Moreover, combined with our analysis in mice, the aforementioned observations suggest that neutralizing Itgβ8 ability to activate TGF-β in patient

Fig. 3 *Itgβ8* expression in Tregs impairs cytotoxic functions of tumor CD8^{POS} T cells. **a, b** Foxp3^{Ctrl} mice, in black, and Foxp3^{ΔItgβ8} animals, in red, were treated or not with depleting anti-CD8β to selectively remove CD8^{POS} T cells. Animals were then injected i.d. with B16 cells. Pictures of tumors are representative of 6–11 animals from two independent experiments and the graph represents the tumor size at day 15 after tumor implantation. **c–f** Foxp3^{ΔItgβ8} mice and their littermate controls (Foxp3^{Ctrl}) were injected either i.d. with B16 cells and tumors and their draining lymph node (dtLN) were analyzed by flow cytometry 15 days later (**c, f**). Counterplots illustrate the ability of CD8 cells to produce granzyme B (GzB) and degranulate based on CD107 cell surface expression CD8^{POS} T cells infiltrating the tumor. Percentages of the gated populations are mentioned on counterplots. Histograms demonstrate the percentage of CD8^{POS} T cells expressing GzB or co-expressing GzB and CD107 in different animals ($n = 7$) from two independent. **d, e** Representative pictures demonstrate TUNEL-positive cells (yellow nucleus), tumor slides were stained with DAPI (blue). The graph illustrates the density of apoptotic cells. Data are representative of two experiments, with 7–8 mice per group. Error bar, mean ± SD. For **b, c, f**, data are presented as mean ± SD. **b** $P = 0.0422$ (*)/ $P = 0.4771$ (ns), **c** $P = 0.0012$ (**)/ $P = 0.0175$ (*), **e** $P = 0.0293$. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. The paired two-tailed Student *t* test for **b**, Unpaired two-tailed Student *t* test for **c**, two-tailed Mann–Whitney for **c–f**. Scale bar: 50 μm. Source data are provided as a Source Data file.

tumors could be associated with stronger CD8 T-cells activation in the TME.

Neutralization of *Itgβ8* exacerbates cytotoxic T-cell function in TME of patients. Finally, we assessed whether neutralizing *Itgβ8* ability to activate TGF-β in patient tumors could affect effector T-cell's ability to respond to TGF-β and develop an efficient anti-tumor response in the TME. To this end, we used an ex vivo culture approach in which two serial sections of live tumors were cultured either in the presence or in the absence of neutralizing anti-*Itgβ8* antibody (Fig. 7a). This technique allowed us to address the effects of the anti-*Itgβ8* antibody on the same TME of the given same patient in which the immune system compartment and its interactions with the tumor tissues were conserved. After treatment, CD8^{POS} T cells from the tumors were analyzed by flow cytometry (Fig. 7b). We first monitored the effects of the anti-*Itgβ8* antibody treatment on TGF-β signaling in patient melanoma. In response to anti-*Itgβ8* antibody, we observed a 30–50% of reduction in phosphorylation of SMAD2/3 in CD8^{POS} T cells from TME demonstrating that neutralizing *Itgβ8* in the human tumors affects the levels of TGF-β signaling in CD8^{POS} T cells infiltrating the TME (Fig. 7c, d). Strikingly, we also observed a 2–5-fold increase of cytotoxic features of CD8^{POS} T cells present in the TME in the majority of the melanoma after anti-*Itgβ8* antibody treatment compared to untreated condition (Fig. 7e, f). Of note, similar observations were made in breast cancers in response to neutralizing anti-*Itgβ8* antibody treatment (Supplementary Fig. 6). Thus, neutralizing *Itgβ8* is sufficient to impair TGF-β signaling in CD8^{POS} T lymphocytes infiltrating human tumors and boost their cytotoxic functions, opening the path toward clinical applications based on *Itgβ8* targeting in cancer.

Discussion

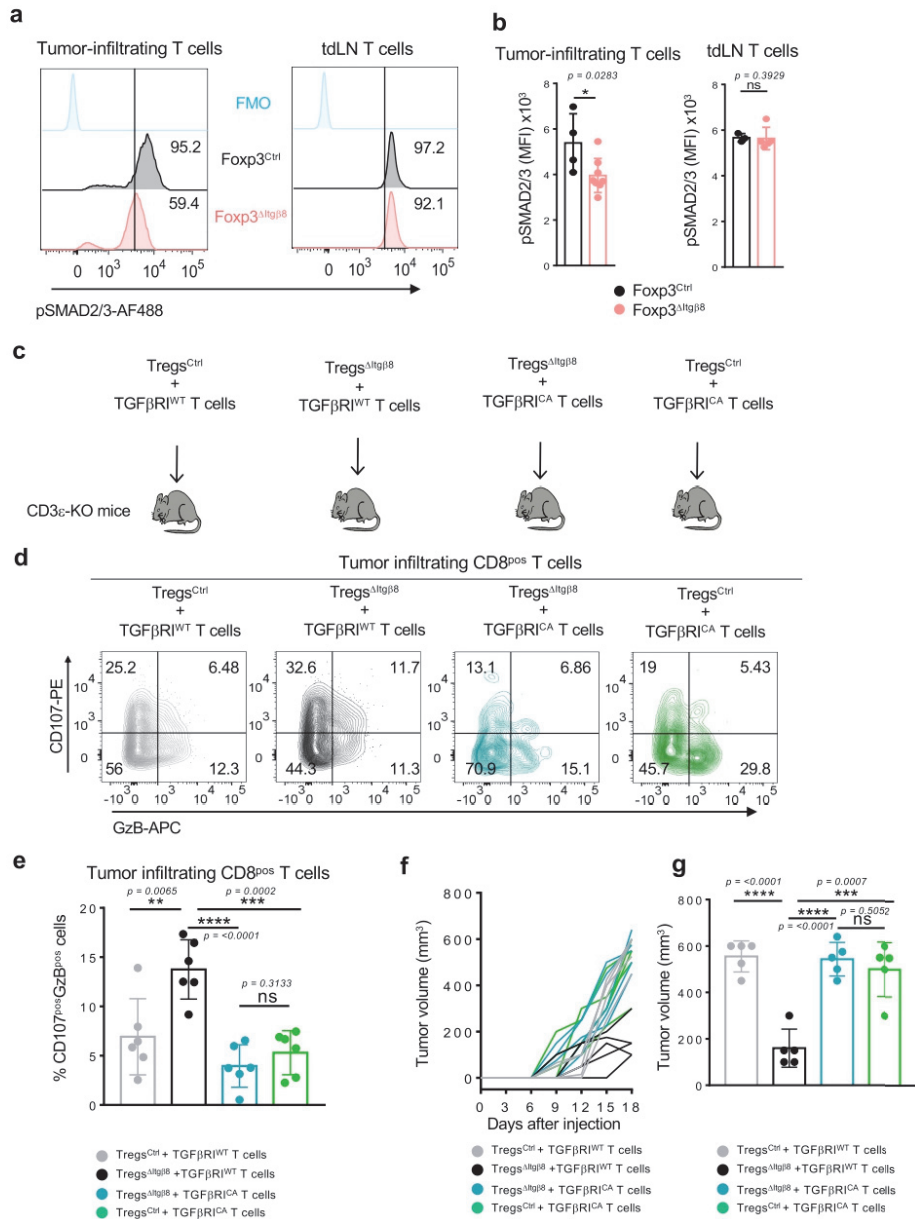
The presence of Tregs in the TME is usually associated with a weakness of the effector T-cell responses and poor prognosis in patients. Though Tregs do not need to produce their own TGF-β1 to repress the effector T-cell functions in the TME¹², this study reveals that Tregs, and particularly the *Itgβ8*^{POS} population, are essential to increase the levels of activated TGF-β produced by cancer cells responsible for efficient repression of T-cell cytotoxic functions within the TME. Thus, this collaborative work between cancer cells and *Itgβ8*^{POS} Tregs increases the ability of the cancer cells to escape the immune system and fosters cancer progression.

In certain cancers, *Itgβ8* expression is observed in tumor cells express and the forced expression of *Itgβ8* in cancer cell lines was associated with TGF-β1 activation in vitro as well as the impairment of metastasis growth and vascularization modifications of the tumors after their implantation in mice²³. Our results do not exclude other cellular actors than *Itgβ8*^{POS} Tregs participate in TGF-β activation in the TME. Indeed, we observed that

TGF-β signaling in T cells infiltrating the tumors is not fully abolished in Foxp3^{ΔItgβ8} mice. However, no role of *Itgβ8*^{POS} cancer cells has been assigned to the regulation of the CD8 T-cell cytotoxic functions in the TME²³. Hence, we propose that once *Itgβ8*^{POS} Tregs colonize the tumor, they help enforce the activation of latent TGF-β1 produced by cancer cells so far ensured by other cells of the TME, including cancer cells themselves in the tumors where they express αvβ8 integrin. This help from the Tregs allows the TME to reach the optimal activation of TGF-β1 which blocks the cytotoxic functions of CD8 T cells and promotes tumor immune escape. The control of TGF-β signaling in CD8 T cells by activating TGF-β1 is likely facilitated by the unique ability of Tregs to be in the close vicinity of CD8 T cells in the TME²⁴. The ability of *Itgβ8*^{POS} Tregs to activate TGF-β1 produced by cancer cells is in agreement with recent biochemical investigations on αvβ8-mediated TGF-β1 activation, made outside the Treg context, suggesting that the latent complex released by a given cell can be activated by αvβ8 integrin expressed by others²⁵. Moreover, Tregs have been shown to be capable of acquiring at their surface latent complex produced by other cells²⁶.

Interestingly, the capacity of *Itgβ8*^{POS} Tregs to increase the levels of bioactive TGF-β1, to ensure repression of the cytotoxic functions of T cells appears particularly of importance in the TME. Indeed, in clear contrast to the TME, the absence of *Itgβ8* expression in Tregs failed to alter TGF-β signaling in effector T cells in the dtLN, implying that either other cells expressing *Itgβ8* or other mechanisms, independent of the *Itgβ8*, play a key role in the activation of TGF-β in the secondary lymphoid organs. In line with this, while a modification on LAP of the RGD sequence recognized by αvβ8 integrin recapitulates the autoimmune syndromes observed in the absence of TGF-β1¹⁴, no signs of autoimmunity nor immune disorders were described in Foxp3^{ΔItgβ8} mice^{17,18}. Moreover, depending on the tissue, the predominant role of certain cells has been depicted in the activation of TGF-β. In the gut, *Itgβ8*^{POS} dendritic cells appear as key activators of TGF-β, whereas in the skin this function seems to be more dependent on keratinocytes^{27,28,29}. In addition, the inflammatory context favors the role of *Itgβ8*^{POS} Tregs in activating latent TGF-β¹⁸. Whether some inflammatory factors present in the TME reduce the expression of *Itgβ8* by other cells than Tregs or repress alternative mechanisms of TGF-β activation could be considered as suggested in the gut³⁰.

The secreted latent complex can be stored in the micro-environment of the secreting cells and thus be accessible to integrins³¹. Our data reveal that cancer cells as a major source of latent TGF-β complex stored in the TME which is activated by *Itgβ8*^{POS} Tregs. However, we do not exclude that *Itgβ8*^{POS} Tregs can also activate TGF-β once secreted. Indeed, one of the features of Tregs is to express at their surface high amounts of the protein GARP, which can bind latent complex, then present it to αvβ8 integrin and thus contribute to the activation of secreted latent TGF-β^{26,32}. However, in contrast to the absence of *Itgβ8*, the



deletion in Tregs of *Itgβ8*, which encodes for GARP, is not sufficient to affect tumor growth³³. While GARP expression on Tregs contributes to the activation of secreted latent complexes, that of Itgβ8 contributes to the activation of latent complexes stored in the TME. Since much of the secreted latent complex of TGF-β is stored in the tissue³¹, this could explain why the absence

of Itgβ8 expression in Tregs, and not that of GARP, is sufficient to influence TGF-β signal given to effector T cells and repress tumor growth.

TGF-β signaling is known to directly affect the CD8 T-cell cytotoxic function⁸. This study reveals that the activation of the latent complex by Itgβ8^{pos} Tregs directly influences the levels of

Fig. 4 **Itgβ8^{POS} Tregs promote TGF-β signaling in intra-tumor T cells affecting their anti-tumor response.** **a, b** Foxp3^{Ctrl} mice (black) and Foxp3^{ΔItgβ8} animals (red) were injected i.d. with B16 cells. Tumors and draining lymph nodes (tdLN) were harvested 15 days later and analyzed by flow cytometry. Representative histogram of the levels of phosphorylation of SMAD2/3 (p-SMAD2/3) in tumor-infiltrating T cells (**a**) percentage of cells with high phosphorylation of SMAD2/3 are indicated on each histogram as well as FMO control. Graphs demonstrate the mean of fluorescence intensity (MFI) ± SD in T cells (**a**). Data are representative of two independent experiments with 4–6 mice per group. **c–g** Purified Tregs from either Foxp3^{Ctrl} mice or Foxp3^{ΔItgβ8} mice were adoptively transferred with Foxp3^{neg} T cells (CD3^{POS}GFP^{neg}) from either *CD4-Cre;Stop^{fl/fl};tgfβ1^{CA};Foxp3^{GFP}* mice (TGFβ1^{CA}) or their littermate controls (TGFβ1^{WT}) in CD3^{eKO} mice. Ten days later, recipient mice were injected i.d. with B16 cells and their tumors were analyzed 16 days after their implantation by flow cytometry. **d** Representative contour plots of CD107 cell surface expression and GzB production by tumor-infiltrating CD8^{POS} T cells are illustrated and percentages of each population mentioned populations are on the counterplots. **e** Graphs illustrate the percentage of GzB^{POS} CD107^{POS} cells and of CD107^{POS} cells among CD8^{POS} T cells infiltrating the tumors. Six mice of each group from two independent experiments were analyzed. Data are presented as mean ± SD. **f** Representative graph illustrating the size of the tumors at different days tumor cell post-injection. *n* = 5 mice per group. **g** Graph represents the tumor size at the end of the experiments. Data are representative of three independent experiments with five recipient mice per group. Means are shown ± SD. **b** *P* = 0.0283 (*)/*P* = 0.3929 (ns), **e** *P* = 0.0065 (**)/*P* = 0.3133 (ns)/*P* = <0.0001 (****)/*P* = 0.0002 (***), **g** *P* = <0.0001 (****)/*P* = 0.5052 (ns)/*P* = <0.0001 (****)/*P* = 0.0007 (***). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, *****P* < 0.001 was determined by two-tailed Mann-Whitney test. ns statistically not significant.

TGF-β signaling delivered to intra-tumor effector CD8 T cells and thus their cytotoxic function. The restoration of TGF-β signaling in effector T cells fully prevents their cytotoxic functions associated with the deletion of Itgβ8 on Tregs and it confirms that the modulation of TGF-β signaling in effector cells by Itgβ8^{POS} Tregs as the main mechanisms of action this regulatory subset in the TME. Based on several observations made in vitro and in the gut, TGF-β has been proposed to promote the conversion Foxp3^{neg} T cells toward Foxp3^{POS} cells in the tumor³⁴. Interestingly, in the absence of Itgβ8^{POS}Tregs, the proportion and the numbers of Tregs remained unchanged within the TME. Moreover, the lack of *Tgfβ1* in cancer cells, which leads to the activate the cytotoxic function of CD8 T cells in the TME, failed to affect Treg homeostasis in the tumor. Hence, further investigations should confirm the ability of the activated TGF-β1 present in the TME to influence T effector cell conversion into Tregs. We recently reported that Itgβ8 expression on Tregs contributes to CD8 T resident memory cell (Trm) development which requires a bioactive source of TGF-β1³⁵. Further investigations, using mouse models with slower growth than B16-F10 should address, whether in the context of TME, this Itgβ8 dependent function of Treg on Trm occurs and could contribute to long-term anti-tumor protection.

Targeting TGF-β effects on the immune cells in the TME is an important field of investigation for numerous companies. Our data strongly suggest that targeting Itgβ8 in patient could lead to potent activation of the T-cell cytotoxic program in the TME and control of the tumor progression. This idea is comforted by our ex vivo experiments, revealing that anti-Itgβ8 antibody treatment impairs TGF-β signaling in effector T cells and is sufficient to boost their cytotoxic functions in the TME of patients. Though the best way to efficiently target Itgβ8 effects in patients needs to define, the exacerbation of the cytotoxic functions of T lymphocytes selectively in the TME suggests that targeting Itgβ8^{POS} Tregs may represent promising immunotherapy avoiding the risk of unleashing massive autoimmunity following a systemic neutralization of TGF-β effects¹⁰.

In sum, this study reveals an unsuspected collaborative mechanism between cancer cells and Tregs with direct consequences on the repression of the anti-tumor function of effector T cells in tumors. Moreover, it provides evidence that targeting Itgβ8 could constitute a promising future anticancer immunotherapy in patients.

Methods

Mice. *Itgβ8-td-Tomato* mice were generated as described¹⁶. Generated animals were cross on *FOXP3-IRES-GFP* background³⁶ to follow Tregs. *FOXP3-Cre^{YFP};Itgβ8^{-/-}* (Foxp3^{Ctrl}) mice *FOXP3-Cre^{YFP};Itgβ8^{fl/fl}* (Foxp3^{ΔItgβ8}) mice¹⁸,

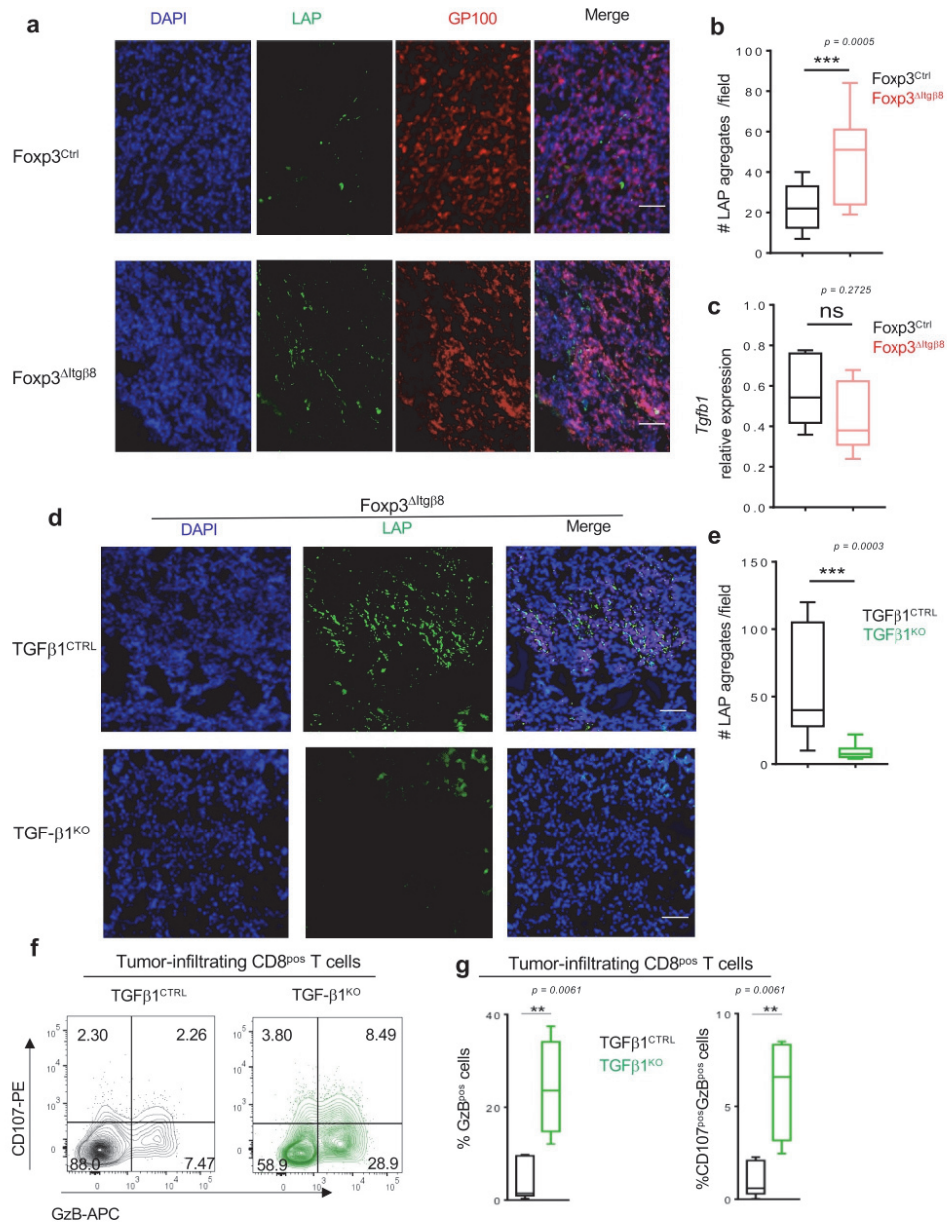
CD4-Cre;Stop^{fl/fl};tgfβ1^{CA};Foxp3^{GFP} mice¹⁹ were used. C57BL/6J mice (stock # 0632) and C57BL/6 CD3^{eKO} (CD3^{KO}) mice (stock # 020456) were purchased (Charles Rivers, France). Importantly, though Itgβ8 is mainly expressed in Tregs, we validated any leakiness of *Foxp3-CRE* construct in Foxp3^{ΔItgβ8} mice, by breeding animals on Rosa26 reported background³⁷. Animals were euthanized with euthanasia automate (Tem Seg) using 50–100% CO₂. All animals were between 2 and 6 months of age, all on a C57BL/6 background. Except for the breast cancer model, both genders were used without any differences between males and females. Foxp3^{Ctrl} mice and Foxp3^{ΔItgβ8} mice littermate were caged together with respect to gender. Mice were maintained in AniCan SPF mouse facility in Lyon, France, in stable temperature between 19–23 °C and 60–65% of hygrometry under a 12-h dark light cycle.

Patient tumors and anti-Itgβ8 antibody treatment. Primary breast adenocarcinoma tumors and primary melanoma were obtained by the Biological Resource Center of Centre Léon Bérard and Hospital Lyon Sud respectively. Primary melanoma, at noninvasive stages, was obtained after surgery in different regions of the body. Primary breast tumors, irrelevant of their hormonal status, were analyzed. No gender (melanoma) and age (breast cancer and melanoma) selection was performed to establish the patient cohort. Importantly, patients never received anticancer treatments prior to surgery. Fresh tumors were treated by the Ex-vivo facility of the Centre Léon Bérard Lyon France. They were embedded in the Ex-vivo facility-specific matrix gel[®] and cut at 250 μm with microtome (Seica). Tumor slides were then cultured on Uvac 1264 in RPMI-completed medium, 1% FCS, 1% HEPES, 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM-NEAA (LifeTechnologies), 1% NaPyruvate (LifeTechnologies) with 20 μg/ml of neutralizing itgβ8 antibody ADWA-16³⁸. Tumor slices were harvested 48 h later, minced with scalpel, and incubated with 5 mg/ml collagenase IV (Gibco) and 1 mg/ml DNase I (Sigma, 11284932001) in RPMI supplemented with 1% FCS and 1% HEPES for 30 min at 37 °C with agitation prior cytometer analysis.

Ethics. Experiments on mice were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union, ARRIVE guideline, and French laws and were validated by the local Animal Ethics Evaluation Committee (CECCAPP) and the French ministry of Research (#9239 and #19584). Patient tumors were obtained after approval of the protocol by the institutional review board and ethics committee, with fully informed patient consent (French Ministry of Research agreement number: AC-2013-1871 and AC-2019-3426).

Cell lines. Breast medullary adenocarcinoma cell lines E0771(CVCL GR23) and melanoma B16-F10 (B16) (CRL 6475) were obtained from ATCC. B16-shTGF-β1 cells were generated by the introduction of shTGF-β1 RNA in B16. Briefly, lentiviral vectors encoding shRNA pLKO.1 puro *Tgfβ1*: NM-011577.1-1753s1c1 and empty vectors were kindly given by Prof. D. Klatzmann (Paris). Infected B16 were selected on puromycin (Sigma, P8833). MLEC cells³⁹, with luciferase activity reporting TGF-β signaling, were used. All cell lines were maintained in DMEM (Gibco, 31966-021) supplemented with 10% FCS (LifeTechnologies, 10270-106), 1% HEPES (LifeTechnologies, 15630-056), 1% penicillin/streptomycin (LifeTechnologies, 15140-122). In total, 250 μg/ml of geneticin (LifeTechnologies, 10131-027) or 5 μg/ml of puromycin (P8833-10MG) were added for MLEC and B16-shTGF-β1 cell culture, respectively. All cell lines were tested negative for mouse pathogens, including mycoplasma by PRIA test (Charles Rivers).

Measure of active TGF-β. MLEC cells³⁹ were incubated with Itgβ8^{neg} or Itgβ8^{POS} Tregs. Luciferase activity was detected via the Luciferase Assay System (Promega, E1500) on a TECAN. TGF-β bioactivity is presented in arbitrary units (Arb.U.) after the withdrawal of the blank value of the medium alone.



Mouse tumor implantation and tissue preparation. In total, 5×10^5 B16 cells were injected intra-dermally (id) in the back skin. In all, 5×10^5 E0771 cells were injected into the abdominal mammary gland # IV. Tumor growth was monitored every 3 days with a caliper in a double-blind manner. Tumor size (mm^3) was calculated as width \times length \times width. Tumors were minced with scalpel, and digested with 1 mg/ml collagenase IV (Sigma, C2674-1G) and DNase I at 1 mg/ml (Sigma, 11284932001) in DMEM supplemented with 1% FCS and 1% HEPES. Tumor draining lymph nodes (tdLN, inguinal) were mechanically ground with glass slides.

Adoptive T-cell transfers. Fxp3^{pos}CD3^{pos} cells from the lymph nodes of *CD4-Cre;Stop^{fl};tgfb1^{CA};Fxp3^{GFP}* mice, *CD4-Cre;Fxp3^{GFP}* mice and CD4^{pos}Fxp3^{pos} cells from Fxp3^{Ctrl} and Fxp3^{Δlgβ8} were purified by cell sorting with ARIA II (BD). In total, 5×10^4 CD4^{pos}Fxp3^{pos} cells mixed with 4.5×10^5 CD3^{pos}Fxp3^{pos} were intravenously injected to CD3^{KO} mice.

CD8^{pos} T-cell depletion. Depletion of CD8^{pos} T cells was performed by intraperitoneal injection of anti-CD8β (BioXCell, clone Lyt3.2; BE0223). In all, 150 μg

Fig. 5 *Itgβ8*^{pos} Tregs activate TGF-β1 produced by cancer cells to repress tumor-infiltrating CD8 T cells. **a–c** Foxp3^{Ctrl} mice and Foxp3^{ΔItgβ8} animals were injected i.d. with B16 cells. 15 days later tumors were harvested and analyzed by immunostaining for LAP and melanoma (GP100), 11–13 field were analyzed for each tumor. The graph illustrates the numbers of LAP aggregates observed per field. **c** Histogram illustrates the expression of *Tgfb1* by RT-qPCR on isolated tumor cells after normalization with *gadh* expression. For **b, c**, data are presented as mean ± SD. **d, e** Foxp3^{ΔItgβ8} animals were injected i.d. with either B16 *shTgfb1* (TGFβ1^{KO}) or B16 cells having received empty vector control (TGFβ1^{Ctrl}), and tumors were harvested 15 days later and analyzed by immunostaining for the presence of LAP aggregates. Graph illustrates the numbers of LAP aggregates observed per field, with 11–12 fields were analyzed for each tumor. **f, g** Foxp3^{Ctrl} mice were injected i.d. with either TGFβ1^{Ctrl} B16 cells (black), 4 tumors, or TGFβ1^{KO} B16 cells (green), 8 tumors, and CD8^{pos} T cells infiltrating the tumors analyzed 15 days later flow cytometry. Representative counterplots illustrating the cytotoxic functions are shown as well as graphs demonstrating the percentage of CD8^{pos} T cells expressing either granzyme B (GzB) or and GzB and CD107. **b** $P = 0.0005$ (***), **f** $P = 0.0061$ (**). All experiments were conducted on four mice per group in three independent experiments. Means are shown ± SD. *** $P < 0.001$ was determined by unpaired two-tailed Student *t* test (**b**) and means are shown ± SD. ** $P < 0.01$ was determined by a two-tailed Mann-Whitney test (**c, e**), **e** is statistically not significant. Scale bar (50 μm). Source data are provided as a Source Data file.

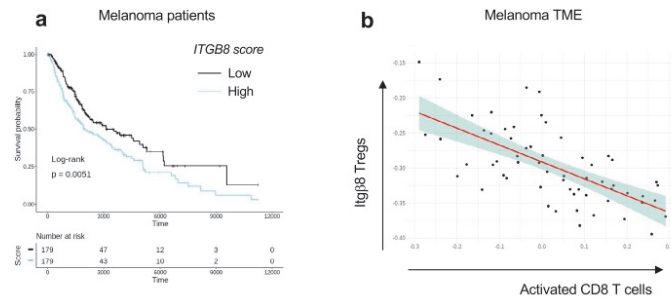


Fig. 6 High *Itgβ8* score on T-cell infiltrating melanoma correlates with patients' worse prognostic and CD8 T-cell activation in the TME. Transcriptome signatures of *Itgβ8*^{pos} Treg cells from patient melanoma were extracted from single-cell RNA-seq data (as described in "Methods"). The extracted signatures were used for testing their association with overall survival on The Cancer Genome Atlas (TCGA) RNA-seq data from melanoma. Tumor samples were classified into low and high, based on the expression on *ITGB8* score. **a** Graph illustrates the overall survival of cancer patients stratified by *ITGB8* score in tumor-infiltrating T cells with time expressed in days. $n = 358$ patients, 179 patients with high expression, 179 patients with low expression log-rank $P = 0.0051$ using Mantel Cox test. **b** Graph illustrating the inverse correlation between with *ITGB8* Tregs core and the activated CD8 T-cell score in the same melanoma. Each dot represents one tumor. Spearman *R* value of correlation: -0.67 .

per mouse were injected 4 days prior to tumor injection and every 4 days all along the experiment. Depletion was systematically checked by flow cytometry on blood samples before tumor injection and on lymph nodes and on the tumors after the experiments using a different anti-CD8β clone (YTS156.7.7, Biolegend).

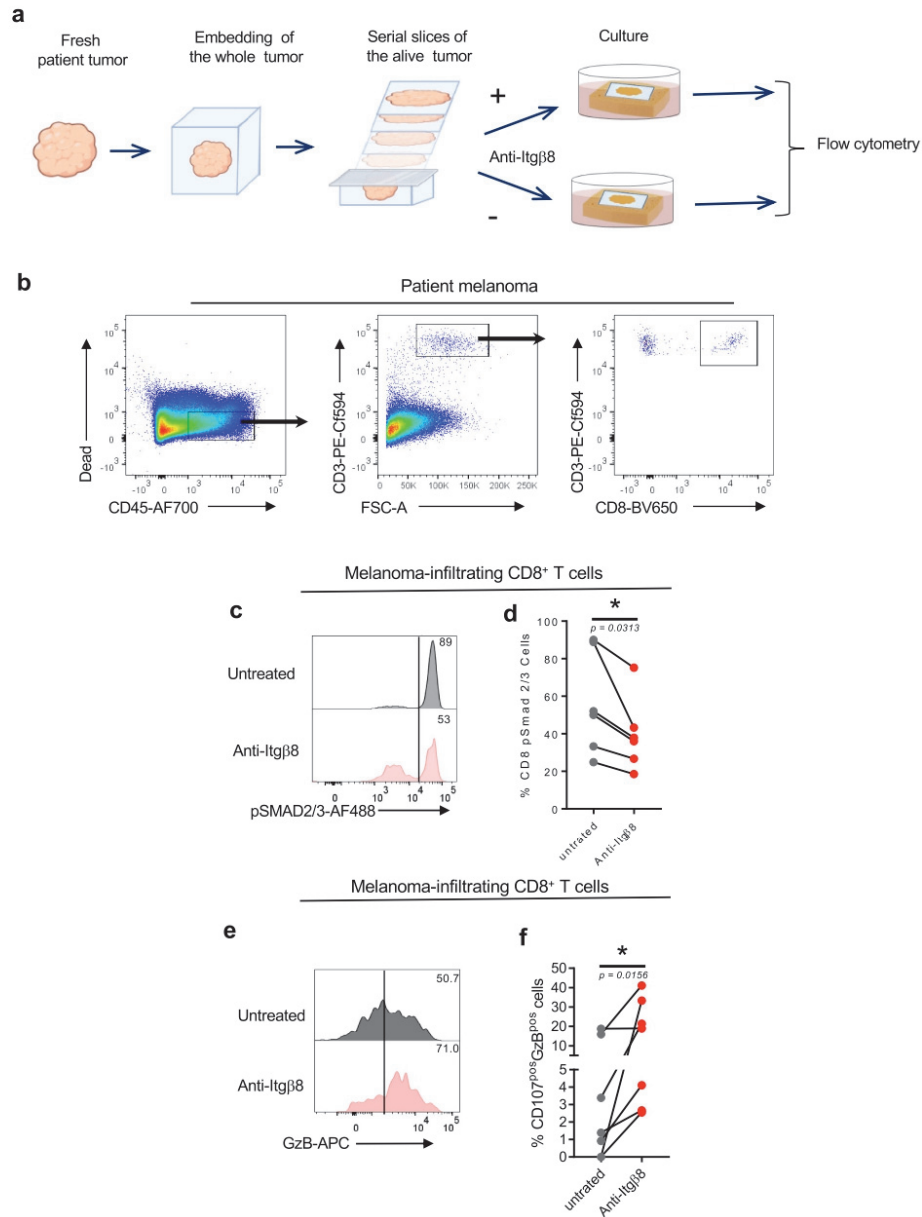
Cell sorting and flow cytometry analysis. Surface staining of mouse cells was performed using the following fluorescent-conjugated antibodies: CD3ε 1/200 (145-2C11; BD biosciences; 561389), CD3ε 2C11; BD biosciences 100210), CD3ε 1/200 (145-2C11; BD; 564378), CD4 1/200 (RM4-5; Biolegend 100540; eBiosciences; 56-0042-82), CD4 1/200 (GK1.5; BD; 563050), CD8α 1/200 (53.6.7; BioLegend; 100748), CD8α 1/200 (53.6.7; BD; 563234), CD8α 1/200 (53.6.7; BD; 563068), CD45 1/200 (30-F11; BD; 557659; BioLegend103116), CD107a 1/100 (eBioD4B, eBiosciences, 13-1071-82), NK1.1 1/100 (PK136; Biolegend; 108748). For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized using Fixation and Permeabilization Buffer kit (00-5523-00, eBiosciences) according to the manufacturer's protocol. Granzyme B 1/100 (GRB05 Invitrogen), Ki67 1/400 (SolA15; ThermoFisher; 46-5698-82) were used. For cytokine staining cells were incubated with brefeldin A (eBioscience), for four hours, IFN-γ 1/100 (XMG1.2 BD bioscience; 563376) staining was performed with Buffer kit (00-5523-00, eBiosciences). For p-SMAD2/3 staining, cells were immediately fixed with Fixation and Permeabilization Buffer kit (00-5523-00 eBiosciences) prior to staining and anti-p-SMAD2/3 1/100 (D27F4, Cell Signaling) was detected with goat anti-rabbit A488 1/100 (Life-Technologies, A11034). For cell sorting, T cells were enriched with Pan T cell isolation kit II mouse (Miltenyi Biotec) and then stained with CD4 (GK1.5; ThermoFisher) and CD8 (53.6.7; BD biosciences). *Itgβ8*-td-Tomato^{pos} Foxp3^{GFP}CD4^{pos} cells, *Itgβ8*-td-Tomato^{pos} Foxp3^{GFP}CD4^{pos} cells, CD4^{pos}Foxp3-YFP^{pos} cells and CD3^{pos}Foxp3-YFP^{neg} cells were sorted on FACS ARIA II. Human cell stainings were performed using the following fluorescent-conjugated antibodies: CD3 1/200 (UCHT1; BD biosciences; 562280), CD45 1/100 (HI30; BD Biosciences; 560566), CD4 1/20 (RPA-T4; Life Technologies; 47-0049-42), CD8 1/100 (SK1; BD biosciences; 565289), CD107a 1/50 (H4A3; BD biosciences; 561345) and Granzyme B 1/100 (GRB05 Invitrogen) p-SMAD2/3 (D27F4, Cell Signaling) was detected with goat anti-rabbit A488 1/100 (LifeTechnologies, A11034). All

samples were acquired on BD Fortessa and data were analyzed with FlowJo Software version X.

Mouse tumor TUNEL and immune-fluorescence staining. Tumors were embedded in Tissue tek OCT compound (Sakura Finetek) and snap-frozen; 10-μm-thick sections were cut with CryoStar NX50 (Microm Microtech France). For TUNEL staining, sections were permeabilized with 0.2% Triton (Sigma, T9284) and digested with Proteinase K (ThermoFisher, K182001). For positive control, sections were incubated with DNase I at 1 mg/ml (Sigma, 11284932001). Sections were then incubated with biotin-16-dUTP (Sigma, 11093070910) and TUNEL enzyme (Sigma, 11767305001) in deoxynucleotidyltransferase buffer (1 mM CoCl₂ (Sigma, 15862-1ml-F), Tris-HCl, 200 mM sodium cacodylate (Sigma, C0250-25G), 0.125% BSA (Sigma, A7906-500G)) at 37 °C for 60 min. Sections were labeled with streptavidin-phycoerythrin (eBiosciences, 12-4317-87), CD8-A488 (53-6.7, BD biosciences). For immunostaining, tumor sections were fixed in 4% PFA (Sigma) and stained with rabbit anti-mouse GP100 1/100 (ab137078 Abcam) was detected with goat anti-rabbit A647 1/100 (LifeTechnologies; A31573) and/or LAP-PE 1/100 (TW7-16B4, Biolegend, 141404). All sections were stained with DAPI (Euromedex, 1050-A) and mounted with Fluoromount (Sigma, F4680-25ml). All samples were acquired on Upright microscope Zeiss Axiomager (SIP 60549) and data were analyzed with Zen 2 (blue edition).

Quantitative real-time PCR. mRNAs were isolated with RNeasy mini kit (Qiagen) and reverse-transcribed with iScript cDNA synthesis kit (Biorad). Quantitative real-time qRT-PCR was performed using LightCycler 480 SYBR Green Master (Roche) and different sets of primers on LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche). Samples were normalized on GAPDH and analyzed according to the ΔΔCt method. Primer sequences are provided in Supplementary Table 1.

Single-cell RNA-Seq analysis. Publicly available single-cell data were used to infer a transcriptome signature of *ITGB8*-expressing T cells and Treg cells across



different tumor types. scRNAseq counts were downloaded from the GEO repository for melanoma (SKCM: GSE115978), colorectal cancer (CCA: GSE108989), liver cancer (HCC: GSE98638), and non-small cell lung cancer (NSCLC: GSE99254). All single-cell data were analyzed with the “Seurat” package v.3.1.0⁴⁰. After creating a seurat object, the sctransform wrapper was used for normalization, scaling, and identification of variable features within each dataset. UMAP projections were used for the visualization of expression and co-expression patterns. The “FindMarkers” function was used with standard settings to identify genes differentially expressed in *ITGB8*^{pos} Tregs (CCA, HCC, and NSCLC). For each set of

ITGB8 single-cell markers, the singscore gene signature scoring method was used to score *ITGB8*^{pos} Treg activity (Foroutan et al.⁴¹). The singscore method uses rank-based statistics to analyze the sample’s gene-expression profile and scores the expression activities of gene sets at a single-sample level.

TCGA data exploitation. Melanoma (SKCM), colon cancer (COAD), liver cancer (LIHC), and lung cancer (LUAD) gene expression and clinical data were downloaded from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) repository [<https://>

Fig. 7 Targeting Itgβ8 in melanoma patients impairs TGF-β signaling and increases cytotoxic functions in tumor-infiltrating CD8^{pos} T cells. Fresh serial sections from the same melanoma for each patient were maintained in culture conditions in the presence or not of neutralizing anti-Itgβ8 antibody as illustrated in (a). **b–e** Forty-eight hours later, CD8^{pos} T cells infiltrating the tumors were analyzed by flow cytometry as illustrated in (b). **c** Representative histograms of the levels of phosphorylated SMAD2/3 (p-SMAD2/3) in tumor CD8^{pos} T cells in the response to anti-Itgβ8 antibody treatment. Percentages of cells with high levels of phosphorylation of SMAD2/3 are indicated. **d** Graph illustrates the percentage of CD8^{pos} T cells positive for p-SMAD2/3 in response to treatment. Each gray dot illustrates the value for tumor CD8^{pos} T cells in the absence of treatment and the linked red dot that of CD8 T cells from the same tumor after anti-Itgβ8 antibody treatment. **e** Representative histograms of the levels of granzyme B (GzB) in tumor CD8^{pos} T cells in the response to anti-Itgβ8 antibody treatment. Percentages of cells producing high levels of GzB are indicated. **f** Graph illustrates the percentage of CD8^{pos} T cells positive for both GzB and CD107 in response to treatment. Each gray dot illustrates the value for tumor-infiltrating CD8^{pos} T cells in the absence of treatment and the linked red dot that of CD8^{pos} T cells from the same tumor after anti-Itgβ8 treatment. $n = 6$ –7 different patients, $*P < 0.05$ was determined by two-tailed Wilcoxon test. **d** $P = 0.0313$ (*), **f** $P = 0.0156$ (*). Source data are provided as a Source Data file.

www.cancer.gov/tcga) using the R packages “TCGAbiolinks” v.2.9.4⁴² and “RTCGA.clinical” v.20151101.8.0 (Kosinski⁴³), respectively. Briefly, each dataset was queried for Illumina HiSeq RNA-Seq results. Downloaded data were pre-processed, normalized and filtered using “TCGAbiolinks” and edgeR (Robinson et al.⁴⁴), and a Itgβ8^{pos} score was calculated for each sample, as described above. Tumor samples were classified into two groups, Low and High, based on the median of the Itgβ8^{pos} score. Survival data (i.e., time to last follow-up and overall survival status), was used to fit a Cox proportional hazards regression model using the “survival” package v.2.44-1.1 [<https://CRAN.R-project.org/package=survival>]. Survival Kaplan–Meier curves were plotted with “survminer” v.0.4.5 [<https://CRAN.R-project.org/package=survminer>]. Additional validations and score correlations were also performed in the melanoma expression dataset⁴⁵.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using paired *t* test, unpaired *t* test, Mann–Whitney or Wilcoxon when appropriate. For survival analysis, Mantel Cox proportional hazard model was used. Differences were considered significant when *P* values were <0.05. Correlation scores were obtained using the Spearman test.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Published Single Cell RNA-seq data used in this study was obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository under accession codes: GSE115978 (<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.006>), GSE108989 (<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0694-x>), GSE98638 (<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.035>), and GSE99254 (<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0045-3>). Gene expression and survival data were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) repository (<https://www.cancer.gov/tcga>), datasets: SKCM, COAD, LIHC, and LUAD), and the National Center for Biotechnology Information database of Genotypes and Phenotypes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap/>) with accession number phs001919 (<https://doi.org/10.1038/s43018-019-0003-0>). All codes used in this study were based on the following R packages: Seurat v.3.1.0 (doi: Article file 070921.doc), singscore v1.10.0 (<https://doi.org/10.1186/s12859-018-2435-4>), TCGAbiolinks v.2.9.4 (<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1507>), RTCGA.clinical v.20151101.8.0, edgeR v.3.31.1 (<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>), survival v.2.44-1.1 (<https://github.com/therneau/survival>), and survminer v.0.4.5 (<https://rpkgs.datanova.com/survminer/index.html>). Data supporting the findings of this study are provided either in supplementary figures or in the Source data file. Source data are provided with this paper.

Received: 4 February 2021; Accepted: 27 September 2021;

Published online: 28 October 2021

References

1. Batlle, E. & Massagué, J. Transforming growth factor-beta signaling in immunity and cancer. *Immunity* **50**, 924–940 (2019).
2. Cerami, E. et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2**, 401–404 (2012).
3. Gao, J. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal* **6**, pii (2013).
4. Shull, M. M. et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693–699 (1992).
5. Marie, J. C., Liggitt, D. & Rudensky, A. Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* **25**, 441–454 (2006).
6. Li, M. O., Sanjabi, S. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* **25**, 455–471 (2006).
7. Gorelik, L. & Flavell, R. A. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat. Med.* **7**, 1118–1122 (2001).
8. Thomas, D. A. & Massagué, J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**, 369–380 (2005).
9. Dahmani, A. & Delisle, J. S. TGF-beta in T cell biology: implications for cancer immunotherapy. *Cancers* **10**, 194 (2018).
10. Huynh, L. K., Hipolito, C. J. & Ten Dijke, P. A perspective on the development of TGF-beta inhibitors for cancer treatment. *Biomolecules* **9**, 743 (2019).
11. Travis, M. A. & Sheppard, D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 51–82 (2013).
12. Donkor, M. K. et al. T cell surveillance of oncogene-induced prostate cancer is impeded by T cell-derived TGF-beta1 cytokine. *Immunity* **35**, 123–134 (2011).
13. Courau, T. et al. TGF-beta and VEGF cooperatively control the immunotolerant tumor environment and the efficacy of cancer immunotherapies. *JCI Insight* **1**, e85974 (2016).
14. Yang, Z. et al. Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *J. Cell Biol.* **176**, 787–793 (2007).
15. Aluwihare, P. et al. Mice that lack activity of alphavbeta6- and alphavbeta8-integrins reproduce the abnormalities of Tgfb1- and Tgfb3-null mice. *J. Cell Sci.* **122**, 227–232 (2009).
16. Nakawesi, J. et al. alphavbeta8 integrin-expression by BATF3-dependent dendritic cells facilitates early IgA responses to Rotavirus. *Mucosal Immunol.* **14**, 53–67 (2020).
17. Edwards, J. P., Thornton, A. M. & Shevach, E. M. Release of active TGF-beta1 from the latent TGF-beta1/GARP complex on T regulatory cells is mediated by integrin beta8. *J. Immunol.* **193**, 2843–2849 (2014).
18. Worthington, J. J. et al. Integrin alphavbeta8-mediated TGF-beta activation by effector regulatory T cells is essential for suppression of T-cell-mediated inflammation. *Immunity* **42**, 903–915 (2015).
19. Doisne, J. M. et al. iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J. Exp. Med.* **206**, 1365–1378 (2009).
20. Bartholin, L. et al. Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the TbetRI/ALK5 receptor. *Genesis* **46**, 724–731 (2008).
21. Long, A. G., Lundsmith, E. T. & Hamilton, K. E. Inflammation and colorectal cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **13**, 341–351 (2017).
22. Plitas, G. et al. Regulatory T cells exhibit distinct features in human breast cancer. *Immunity* **45**, 1122–1134 (2016).
23. Takasaka, N. et al. Integrin alphavbeta8-expressing tumor cells evade host immunity by regulating TGF-beta activation in immune cells. *JCI Insight* **3**, (2018).
24. Curiel, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10**, 942–949 (2004).
25. Campbell, M. G. et al. Cryo-EM reveals integrin-mediated TGF-beta activation without release from latent TGF-beta. *Cell* **180**, 490–501.e116 (2020).
26. Tran, D. Q. et al. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 13445–13450 (2009).
27. Travis, M. A. et al. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* **449**, 361–365 (2007).
28. Hirai, T. et al. Keratinocyte-mediated activation of the cytokine TGF-beta maintains skin recirculating memory CD8(+) T cells. *Immunity* **50**, 1249–1261.e1245 (2019).

29. Worthington, J. J., Czajkowska, B. I., Melton, A. C. & Travis, M. A. Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor-beta and induce Foxp3+ regulatory T cells via integrin alphavbeta8. *Gastroenterology* **141**, 1802–1812 (2011).
30. Chanab, D., Boucard-Jourdin, M. & Paidassi, H. Gut inflammation in mice leads to reduction in alphavbeta8 integrin expression on CD103+CD11b-dendritic cells. *J. Crohns Colitis* **11**, 258–259 (2017).
31. Hinz, B. The extracellular matrix and transforming growth factor-beta1: tale of a strained relationship. *Matrix Biol.* **47**, 54–65 (2015).
32. Lienart, S. et al. Structural basis of latent TGF-beta1 presentation and activation by GARP on human regulatory T cells. *Science* **362**, 952–956 (2018).
33. Vermeersch, E. et al. Deletion of GARP on mouse regulatory T cells is not sufficient to inhibit the growth of transplanted tumors. *Cell Immunol.* **332**, 129–133 (2018).
34. Maruyama, T., Konkel, J. E., Zamarron, B. F. & Chen, W. The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin Immunol.* **23**, 418–423 (2011).
35. Ferreira, C. et al. Type 1 Treg cells promote the generation of CD8(+) tissue-resident memory T cells. *Nat. Immunol.* **21**, 766–776 (2020).
36. Wang, Y. et al. Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **180**, 1565–1575 (2008).
37. Srinivas, S. et al. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev. Biol.* **1**, 4 (2001).
38. Dodagatta-Marri, E. et al. Integrin alphavbeta8 on T cells suppresses anti-tumor immunity in multiple models and is a promising target for tumor immunotherapy. *Cell Rep.* **36**, 109309 (2021).
39. Abe, M. et al. An assay for transforming growth factor-beta using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Anal. Biochem.* **216**, 276–284 (1994).
40. Stuart, T. et al. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **177**, 1888–1902.e1821 (2019).
41. Foroutan, M. et al. Single sample scoring of molecular phenotypes. *BMC Bioinform.* **19**, 404 (2018).
42. Colaprico, A. et al. TCGAAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res.* **44**, e71 (2016).
43. Kosinski, M. RTCGA. clinical: clinical datasets from The Cancer Genome Atlas Project. R package version 20151101.14.0 (2019).
44. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).
45. Abril-Rodriguez, G. et al. PAK4 inhibition improves PD-1 blockade immunotherapy. *Nat. Cancer* **1**, 46–58 (2020).

Acknowledgements

The expert assistance of V. Bernet, S. Rodriguez, E. Guillemot, and H. Tarayre is acknowledged as well as the advices and analysis from V. Fontanier. We also thank Drs. S. Soudja and V. Dardalhon for critical comments and the Marie lab members for their helpful discussions. We thank Dr. Bartholin for sharing TGFβR1^{CA} mice and Prof. Ribas for sharing data on melanoma patients. The help of the core facilities of the CRCL: PIC (Microscopy), Flow cytometry, Anican and B. Manship for editing is also acknowledged.

This work was supported by grants from LabEx DEVweCAN ANR investissement d'Avenir ANR-10-LABX-61 (J.C.M.), the Helmholtz-DKFZ-Inserm program (J.C.M.), BMS foundation Grant, and Fonceur contre le cancer, ARC grant # 2019-1047, the labélisation ligue Nationale contre cancer (J.C.M. EL-2016 and EL-2021), Agence Nationale de la Recherche ANR-13-PDOC-0019 (H.P.) and People Program (Marie Skłodowska-Curie Actions) of the European Union (PIIF-GA-2012-330432) (H.P.). A.L. was supported by a LabEx DEVweCAN grant and Ligue Nationale Contre le Cancer. O.L. was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer and S.T. by a PhD fellowship from the French Ministry of Higher Education. The SIRIC LYRICAN INCa-DGOS-Inserm_12563 is acknowledged.

Author contributions

A.L., O.L., and J.C.M. planned, conducted experiments, and analyzed the data. H.H.-V. performed bioinformatic analysis. S.T. and H.P. generated the *Igfb8-di-Tomato* mice. S.L., A.L., and O.L. performed patient-tumor ex vivo cultures and A.S. tumor-cell injections and double-blind tumor measurements. D.S. provided the anti-Igfb8 antibody, S.D. patient melanoma, and M.A.T. *Igfb8^{fl/fl}* mice. J.C.M. wrote the manuscript. H.P. and M.A.T. performed comments and corrections. J.C.M. supervised the study.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26352-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Julien C. Marie.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

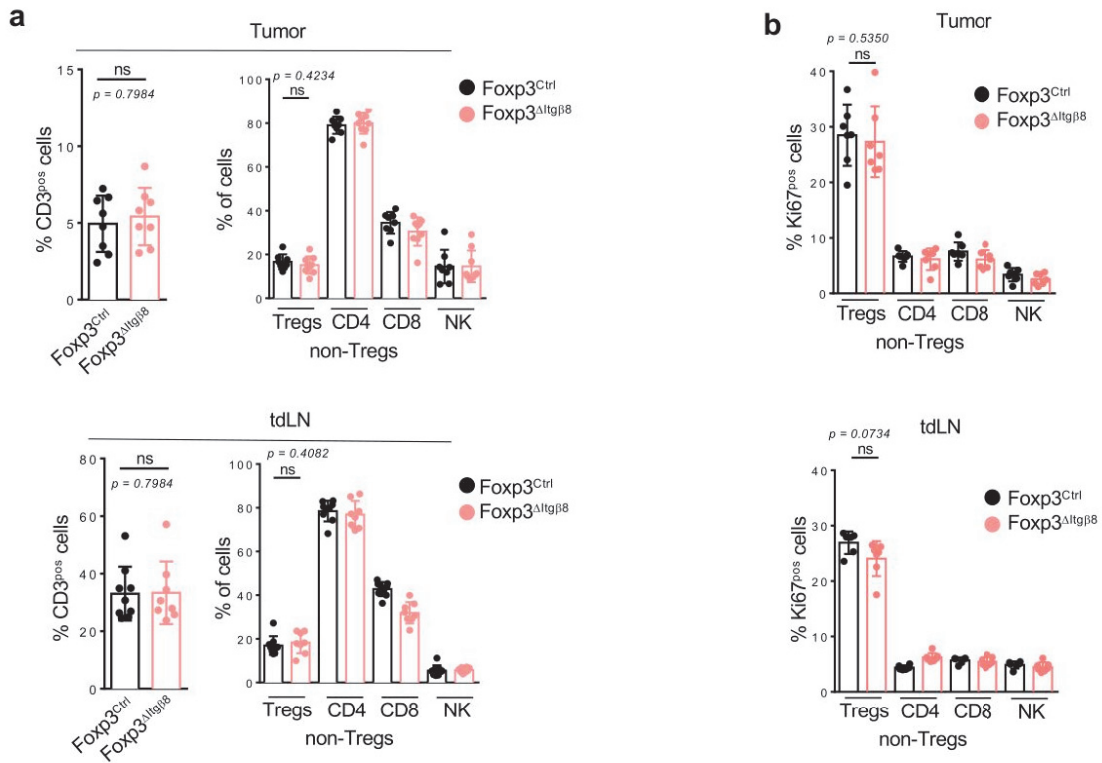
Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



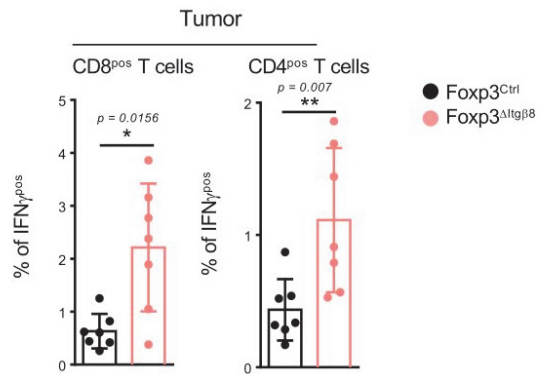
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



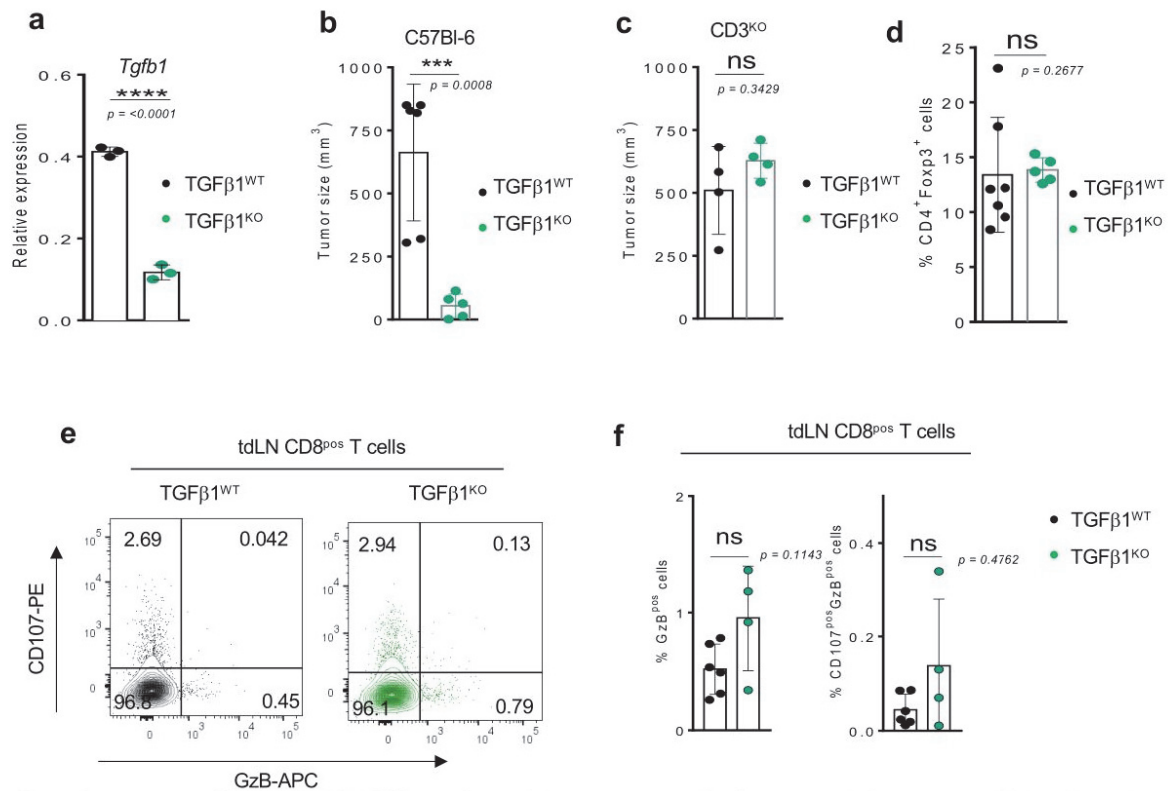
Supplementary figure 1: Itg β 8 Tregs do not impact homeostasis of tumor infiltrating immune cells

Fxp3^{Ctrl} and Fxp3^{ΔItg β 8} mice were injected i.d. with B16 cells in the back. Both Tumor and tumor-draining lymph nodes (tdLN) were analyzed by flow cytometry day 15 after tumor implantation. **a)** Graphs illustrates the percentage of T cells among the hematopoietic cells of different effectors cells and Tregs. **b)** Graphs demonstrate the percentage of cells Ki67^{pos} cells among Tregs and different effector immune cell populations. Data are representative of 2 experiments with 7-8 mice per groups. Means are shown \pm SD. was determined by two-tailed Mann Whitney test. ns: statistically not significant. Source data are provided as a Source Data file.



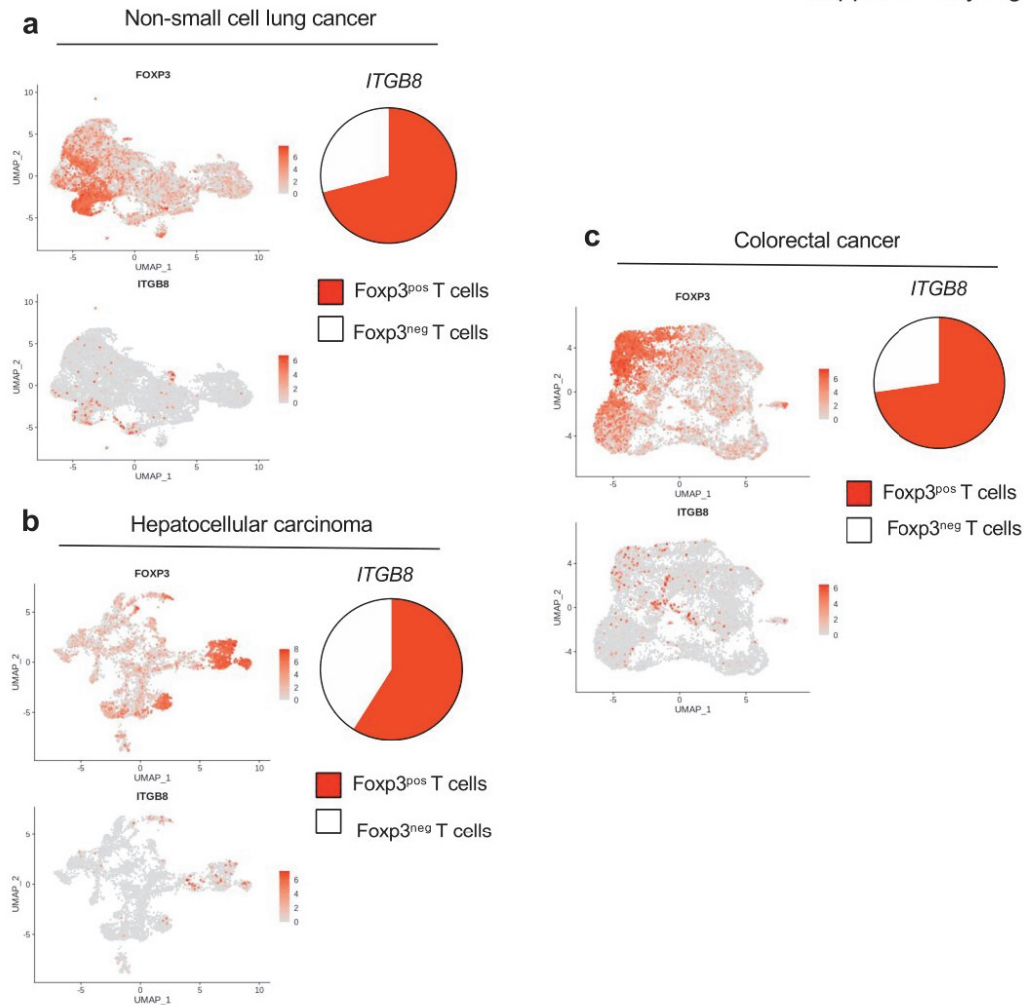
Supplementary figure 2: Itgβ8^{pos} Tregs impair IFN- γ production of T cells in the tumor

T cells infiltrating the tumor (B16) were analyzed for their ability to produce IFN- γ 15 days after implantation. Graph demonstrates the percentage of IFN- γ positive cells among either CD8^{pos} T cells or CD4^{pos} T cells from different animals (n=7) from 2 independent experiments. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; unpaired two tailed Student's t, mean \pm SD. $p = 0.0156$ (*) / $p = 0.0070$ (**). Source data are provided as a Source Data file.



Supplementary figure 3: TGFβ1 produced by cancer cells is essential to control T cell anti-tumor response

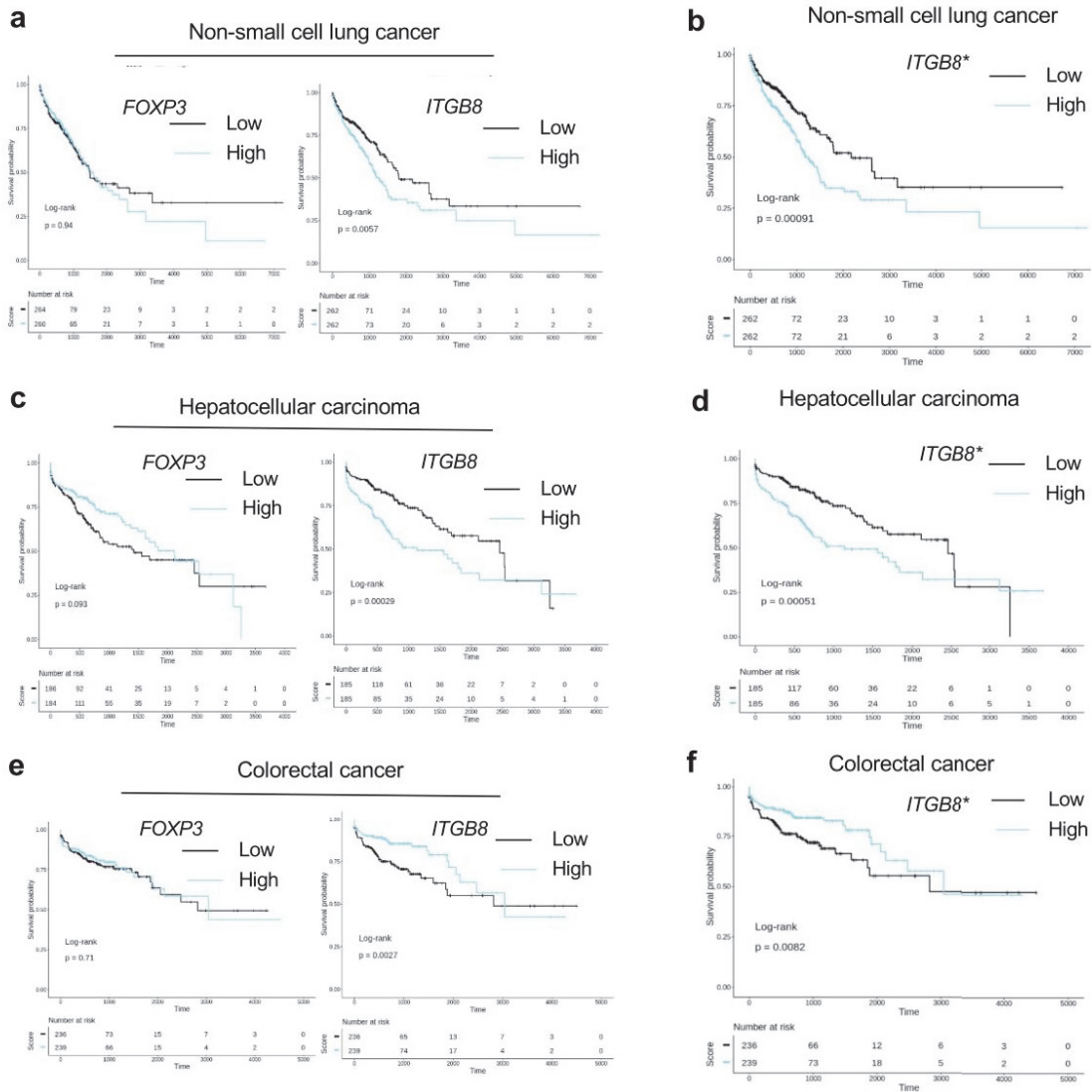
a) Graph demonstrates the expression levels *Tgfb1* in B16 *shTgfb1* (TGFβ1^{KO}) B16 cells as well as in their TGFβ1^{CTRL} control cell line after RTqPCR analysis and normalization with *gadph* expression. TGFβ1^{KO} B16 cells and TGFβ1^{CTRL} B16 cells were injected i.d either C57Bl/6 mice (**b**, **d-f**) or in CD3^{KO} mice (**c**). **b** and **c** illustrate the final volume of the tumors 15 days later. **d**) Graph illustrates the percentages of Tregs among CD4 T cells within the tumors obtained after flow cytometry analysis. (**e-f**) CD8^{pos} T cells from the tumor draining lymph node (tdLN) were analyzed by flow cytometry. Representative counter plots illustrating the cytotoxic functions are shown (**e**) as well as graphs demonstrating the percentage of CD8^{pos} T cells expressing either granzyme B (GzB) and CD107 (**f**), data are representative for 4-6 tumors per group. For bar graphs means are shown ± SD. ** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ unpaired two tailed Student's t test for A-C. Mann Whitney test was used for E-F. ns: statistically not significant. Sup 3A $p = <0.0001$, sup 3B $p = 0.0008$. Source data are provided as a Source Data file.



Supplementary figure 4: *ITGB8* is expressed on tumor infiltrating Tregs in patients

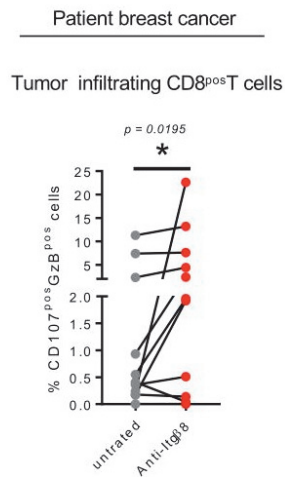
Transcriptomic analysis from single cell RNAseq data obtained T cell infiltrating non-small cell lung cancer (**a**), hepatocellular carcinoma (**b**) and colorectal cancer (**c**). DimPlots and pie-charts show the proportion of *ITGB8*-expressing cells among *FOXP3* negative and *FOXP3* positive T cells for each of the datasets of the different tumors. Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary Fig. 5



Supplementary figure 5: High Itgβ8 score on TME T cell correlates with patient worse prognostic in several tumor types

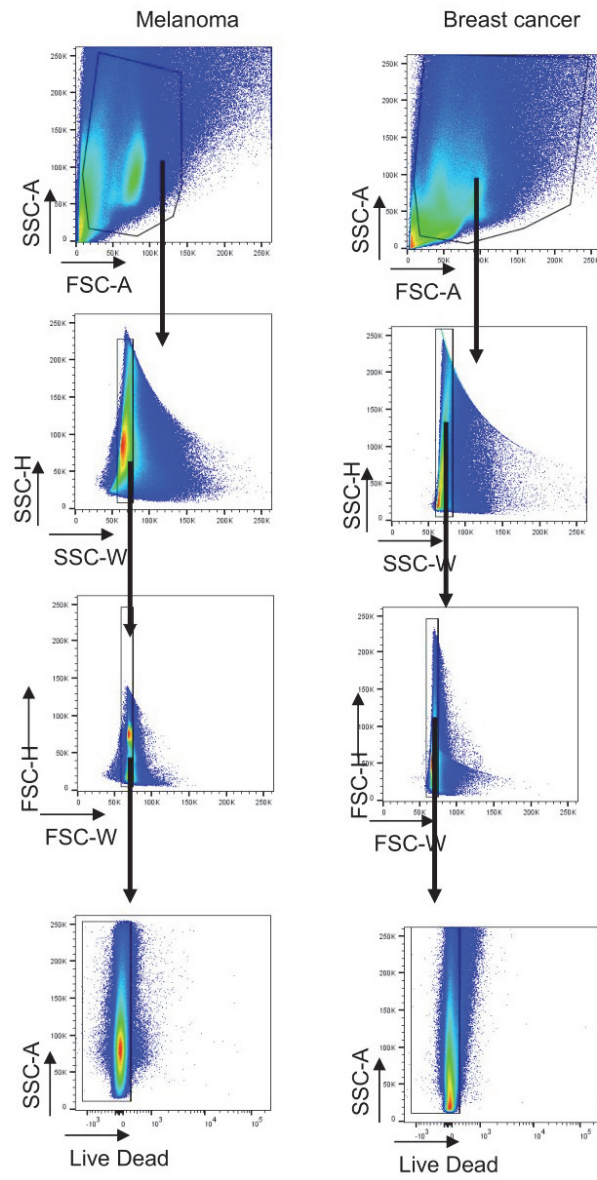
Transcriptome signatures of Itgβ8^{pos} Treg cells deprived of Treg activation signature or not from non-small cell lung cancer (a-b), hepatocellular carcinoma (c-d) and colorectal cancer (e-f) were extracted from single cell RNAseq data, (as described in Methods). The extracted signatures were used for testing their association with overall survival on The Cancer Genome Atlas (TCGA) RNAseq data from their respective tumor type. Tumor samples were classified into Low and High, based on the expression of FOXP3, ITGB8 score and ITGB8 deprived of activation (ITGB8*). Graph illustrate the overall survival of cancer patients stratified by these scores in tumor infiltrating T cells with time expressed in days. n = 524/290/572 patients for non-small cell lung cancer, hepatocellular carcinoma and colorectal cancer respectively. log rank value are mentioned on the graphs based Mantel-Cox test.



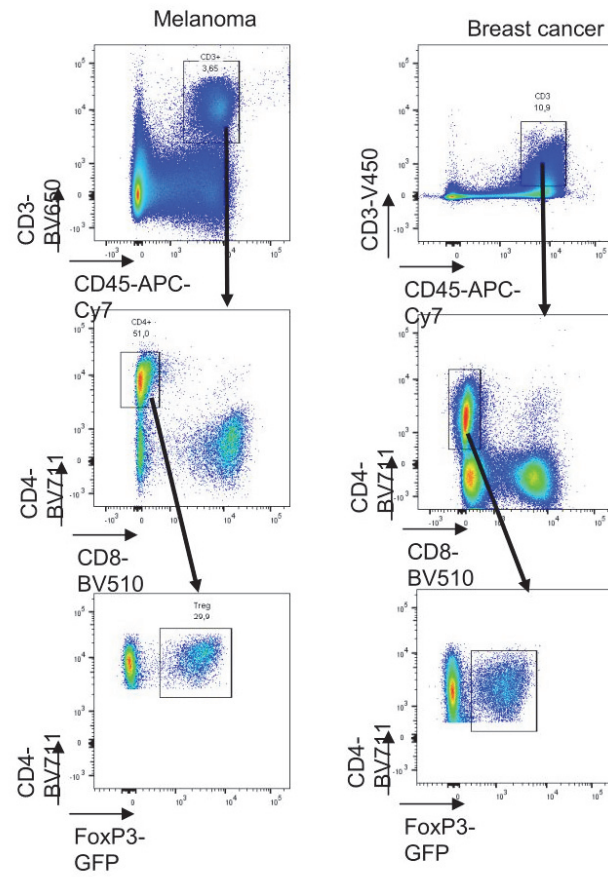
Supplementary figure 6: anti-Ilgβ8 antibody treatment increases cytotoxic functions CD8 T cells infiltrating breast cancer patients

Fresh serial sections from a same breast cancer for each patient were maintained in culture conditions in the presence or not of neutralizing anti-Ilgβ8 antibody. 48 hours later CD8^{pos} T cells infiltrating the tumors were analyzed by flow cytometry. Graph illustrates the percentage of CD8^{pos} T cells positive for granzyme B (GzB) and CD107, confirming the degranulation, in response to treatment. Each grey dot illustrates the value for tumor CD8^{pos} T cells in the absence of treatment and the linked red dot that of CD8^{pos} T cells from the same tumor after anti-Ilgβ8 antibody treatment. n=11 different patients, * $p < 0.05$ was determined by two-tailed Wilcoxon test. $p = 0.0195$. Source data are provided as a Source Data file.

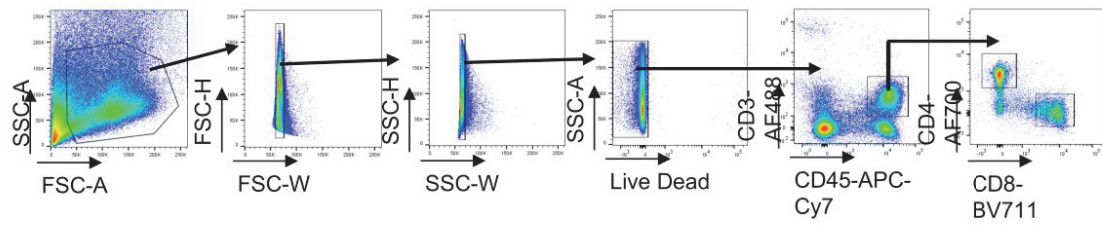
Gating strategy used for Figure 1a



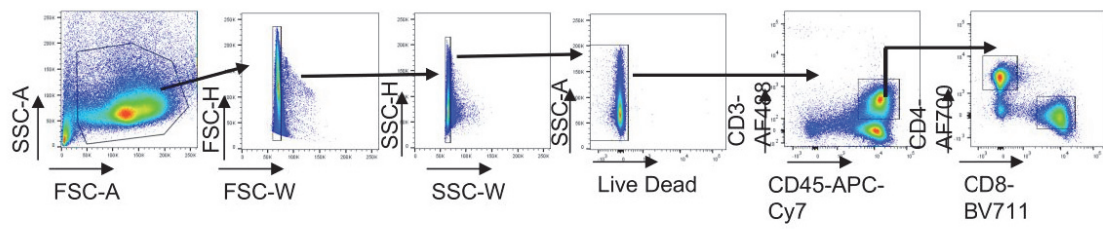
Gating strategy used for Figure 1g



Gating strategy used for the analysis of tumor T cells in fig 3c-f Fig 4 a-e and Figure 5e

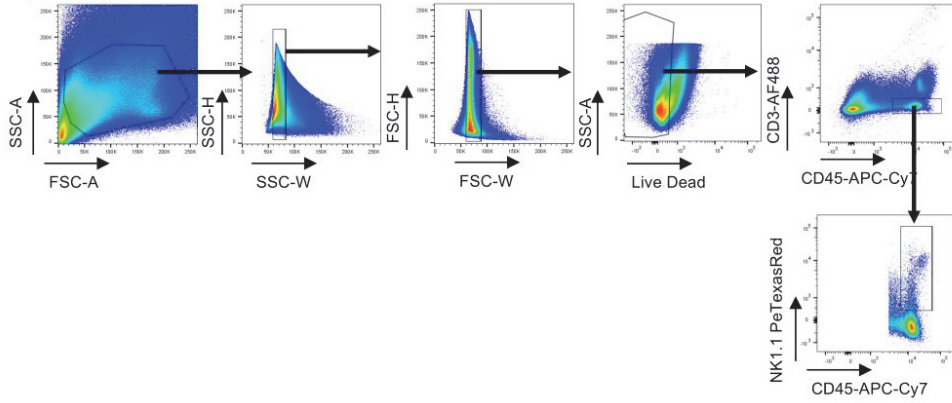


Gating strategy used for the analysis of tumor draining lymph node T cells in Fig 3f and supplementary Fig 3e



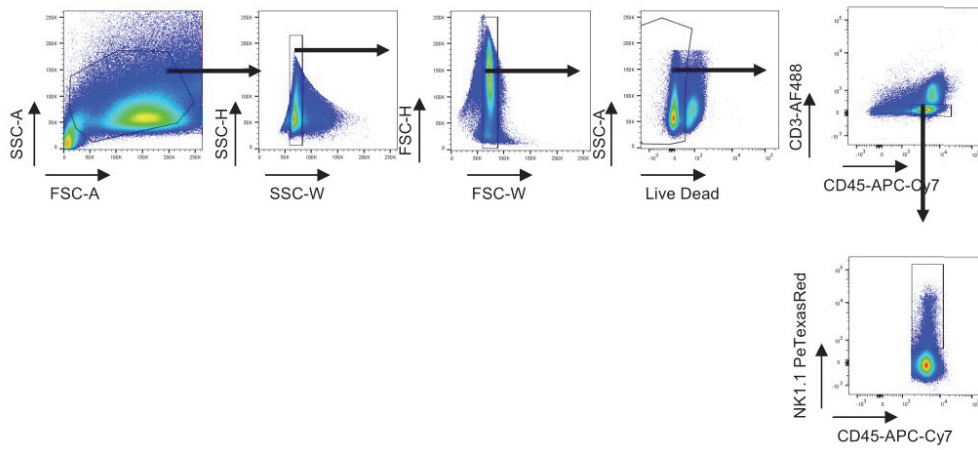
a

Gating strategy used for supplementary figure 1a (tumor)

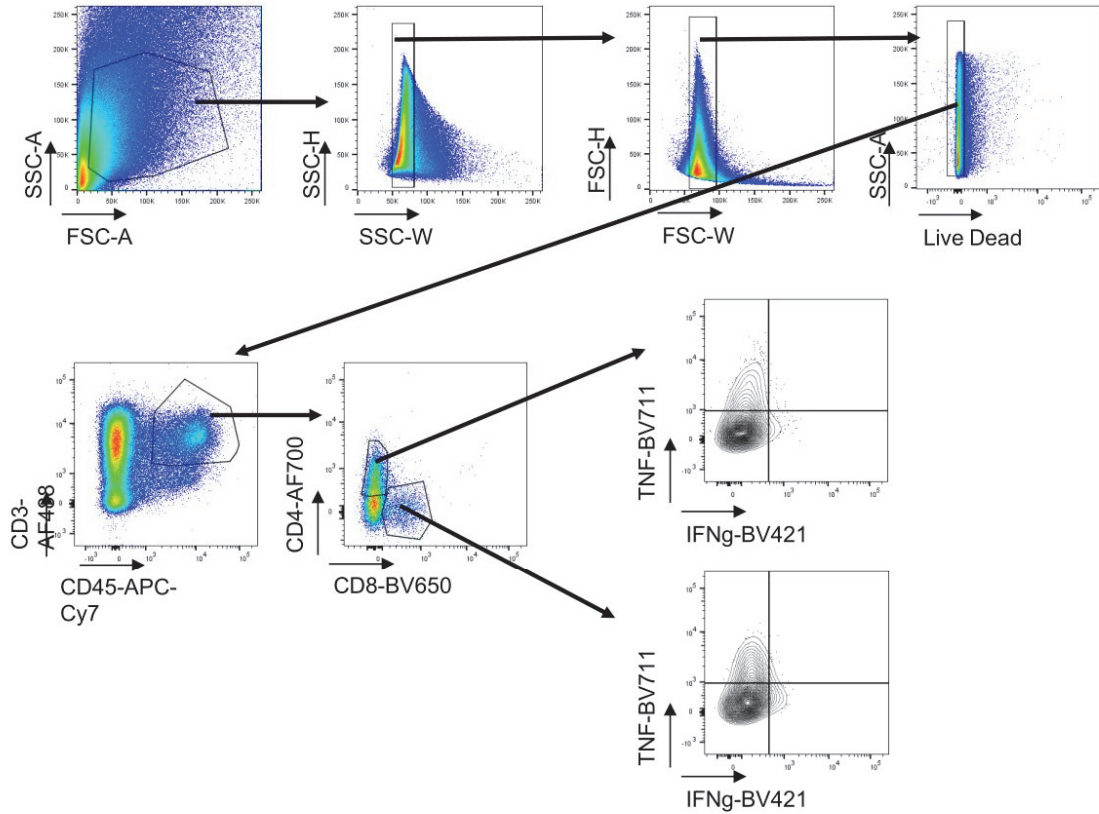


b

Gating strategy used for supplementary figure 1a (tdLN)



Gating strategy used for supplementary Figure 2



Primer sequences used for Q-PCR

Primers	Sequence 5' → 3'
mTGF- β 1 (forward)	ATCCTGTCCAAACTAAGGCTCG
mTGF- β 1 (reverse)	ACCTCTTTAGCATAGTAGTCCGC
GAPDH (forward)	AGGTCGGTGTAACGGATTTG
GAPDH (reverse)	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

Article 2 : TGF- β Increases TCR Activation Threshold by Cancer Cell Antigens Allowing Weak Immunogenic Cancer Cell Progression

Résumé du deuxième article : (non publié)

La faible immunogénicité des tumeurs solides établies peut s'expliquer par la faible capacité des cellules T CD8 à monter efficacement une réponse aux antigènes des cellules cancéreuses. On pense que cette déficience des fonctions des cellules T CD8 est conditionnée en grande partie par le micro-environnement tumoral (TME). L'une des particularités du TME des tumeurs solides est d'être fortement enrichi en facteur de croissance transformant bêta (TGF- β 1) sécrété principalement par les cellules cancéreuses.

Ici, en utilisant le gain et la perte de la signalisation TGF- β sélectivement dans le TME ou les cellules T CD8, nous révélons que la signalisation TGF- β dans les cellules T CD8 contrôle le seuil d'activation du TCR. La signalisation du TGF- β favorise la conformation de la protéine LCK dans sa forme inactive en stabilisant la protéine CSK par l'intermédiaire de l'activation de la protéine FAK. Cette activation est médiée par la voie non-canonique du TGF- β . Par conséquent, la force du signal donné au TCR pour activer la fonction cytotoxique des cellules T CD8 en présence de TGF- β doit être plus forte. Les cellules T CD8 échappant au contrôle de la signalisation du TGF- β éliminent efficacement les cellules cancéreuses même si elles portent un antigène de faible affinité pour leur TCR, alors que les cellules T CD8 recevant la signalisation du TGF- β ne répondent pas aux antigènes faibles exprimés par les cellules cancéreuses, ce qui entraîne un avantage sélectif de ces cellules.

Ainsi, cette étude révèle que les cellules cancéreuses, en sécrétant du TGF- β 1, augmentent le seuil d'activation du TCR des cellules T CD8 présentes dans la TME, permettant ainsi l'échappement immunitaire des cellules cancéreuses portant des antigènes de faible affinité.

TGF- β Increases TCR Activation Threshold by Cancer Cell Antigens Allowing Weak Immunogenic Cancer Cell Progression

Ossama Labiad^{1,2,3,4}, Farhan S. Cyprian^{1,2,3,4+}, Ana Hennino^{1,2,3,4}, Hélène Tarayre^{1,2,3,4},
Sophie L  on³ and Julien C. Marie^{1,2,3,4*}

Affiliations:

¹ Department Tumor Escape Resistance, Immunity, Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, F-69373, France.

² Université Lyon 1, Lyon, F-69000, France.

³ Centre Léon Bérard, Lyon, F-69008, Lyon, France.

⁴ Labex DEVweCAN, Lyon, F-69008, France.

+ present address: University of central Lancashire, United Kingdom.

*To whom correspondence should be addressed: Julien.marie@inserm.fr

Running title: TGF- β and TCR activation

Abstract 133 words

The maintenance and progression of tumors is largely associated with the weak ability of some cancer cell clones to engage the T Cell Receptor (TCR) of the infiltrating CD8 T lymphocytes. However, whether factors from the tumor micro-environment (TME) can directly influence the TCR signaling stimulation by cancer cells remains illusive. Here, we show that, through its non-canonical pathway, TGF- β signaling represses the activation of the early TCR kinase protein LCK by stabilizing CSK through its action on FAK in the TME. Subsequently, TGF- β signaling forces CD8 T cells to receive stronger TCR stimulation by cancer cell antigens to efficiently eliminate the tumor. Thus, this study reveals TGF- β as a unique cytokine of the TME capable to control the TCR activation threshold with direct consequences on cancer cell antigen immuno-editing and tumor maintenance.

Introduction

The elimination of solid tumors by the immune system is mainly conditioned by the ability of cytotoxic CD8 T lymphocytes (CTL) to enter to the tumor and exercise their cytotoxic functions against cancer cells which bare cognate antigens capable to trigger their TCR. However, tumor analyses frequently showed that infiltrating CD8 T cells can remain inactivated in the TME, leading to tumor progression. These observations pointed-out that the existence of immunosuppressor factors in the TME that impair the activation of the recently recruited effector CD8 T cells¹. Deciphering these immunosuppressor mechanisms is thus essential to understand how tumors escape from the immune response and propose novel efficient targets for immunotherapies.

Transforming Growth beta (TGF- β) is regarded as the most potent cytokine capable to block CTL activation, with direct consequences on tumor maintenance and progression^{2,3}. Consequently, targeting TGF- β in TME or its signaling in CD8 T cells is currently an intense field of activity with numerous pre-clinical and clinical trials⁴. However, the mechanisms by which this polypeptide represses CTL activation in the TME remain totally elusive.

Three forms of TGF- β (β 1, β 2 β 3) exist and in the TME, TGF- β 1 is prevalent^{5,6}. Within the tumor, the source of TGF- β 1 repressing CTL cell activation is largely provided by the cancer cells per se, whereas TGF- β produced by Cancer Associated Fibroblast (CAF) prevents the capacity of CD8 T cells from colonizing the tumor⁷⁻¹¹. One particularity of TGF- β is to be secreted in an inactive form. Hence, cancer cells secrete a form of TGF- β 1 unable to interact with TGF- β receptor (TGF β R) and thus to provide any signaling. This inactive form of TGF- β 1 is largely stored on the extra-cellular matrix of the TME⁷. In the TME, the activation of TGF- β 1 is essential to repress CTL functions and it is mainly provided by regulatory T cells

(tregs) expressing the $\alpha\beta 8$ integrin^{7,12}. Through the $\alpha\beta 8$ integrin, Tregs remove the Latent Associated Protein (LAP) which masks the site of TGF- β 1 interaction with its receptor^{7,13}. This collaboration between cancer cells and $\alpha\beta 8^{\text{pos}}$ Tregs allows to provide the bio-active source of TGF- β 1 which can signal in CTL and prevent their optimal activation in the TME^{2,7}.

All forms of activated TGF- β signal through a common receptor, composed of two TGF- β RI and two TGF- β RII receptors. Signaling is initiated by the binding of activated TGF- β to TGF- β RII, which leads to the autophosphorylation of their kinase domains, which in turn phosphorylates the TGF- β RI. The latter then phosphorylates the receptor associated R-SMADs (SMAD2 and/or SMAD3), which then can bind to either SMAD4 or TRIM33. The complexes then migrate to the nucleus where they regulate the expression of various genes. In addition, to the SMAD4/TRIM33-dependent pathways, an alternative branch exists involving other actors such as MEK/MAP kinase^{14,15}. Though the role for TGF- β signaling in preventing CTL activation in the TME is well admitted, its action mode remains totally elusive.

In the TME, CD8 CTL activation is initiated by the strength of the interaction of their TCR with peptides embedded in major histocompatibility complex class I (MHC-I) present at the surface of cancer cells. This strength is dictated by both the number and the affinity of TCR /peptide-MHC interactions, which should be high enough to induce a fully efficient TCR signaling leading to the CTL activation¹⁶. According to the paradigm, constant pressure from the CTL response coupled with the genetic instability of cancer cells can select for cancer subclones with reduced immunogenicity that escape the immune recognition and thus destruction by CTL. However, whether this immunoediting process can be influenced by factors present in the TME is unknown.

In this study, we revealed that TGF- β signaling plays a role the immunoediting. We showed that TGF- β signaling in CD8 T cells favor the progression of poorly immunogenic

cancer cells. By interfering with the early step of TCR signaling, TGF- β signaling in CD8 T cells increases the TCR activation threshold by cancer cell antigens that is mandatory for CTL to be functional in the TME and thus contribute to the maintenance and progression of weak immunogenic cancer cells.

Results

TGF- β prevents elimination of weak immunogenic cancer cell by CTL

A solid tumor is composed of cancer cells which can differ in their immunogenic potentials due to their expression of high or weak antigens for the TCR of infiltrating CD8 T cells. Thus, first, we analyzed whether activated TGF- β in the TME affects the ability of CTL to eliminate cancer cells dependently on their immunogenicity. We took advantage of Foxp3-CRE;Itgb8^{fl/fl} (TGF- β ^{low} TME) mice in which TGF- β activation was selectively impaired in the TME⁷. Subsequently, in TGF- β ^{low} TME mice, the TGF- β signaling in CD8 T cells was reported to be profoundly decreased and the CTL functions exacerbated⁷. Importantly, in TGF- β ^{low} TME animals, the recruitment of CD8 T cells within the TME is not affected⁷. To selectively target the TCR of CTL, we used the well-described F5 TCR transgenic mice¹⁷. CD8 T cells from F5; Rag2^{KO} mice, which recognize H2-D^b MHC-I loaded with A/NT/60/68 influenza virus peptide (NP68)¹⁷ were activated *in vivo* after injection of the cognate peptide and then transferred in either TGF- β ^{low} TME mice or their littermate control (TGF- β ^{high} TME). To allow cancer cells to engage F5 TCR with different strength, we generated melanoma cell line bearing strong or weak antigens for the F5 TCR due to a selective mutation in the NP68 peptide, leading to a factor 1000 of ability to activate the F5 TCR between the two peptides^{17,18}. In order to discriminate the two cancer cells within the tumor, the two clones expressed different fluorochromes, (Enhanced Green Fluorescent Protein and mRuby2). Notably, similar

growth of each clone was observed in C57BL/6 mice (Figure S1A) and a 50:50 ratio (weak:strong) of cancer cells was maintained in CD3 KO mice (Figure S1B), ruling out any clone intrinsic defect of growth or a different in immunogenicity between the clone that could be due to the fluorochromes.

In line with previous observations^{3,7}, the implantation of the 50:50 ratio in TGF- β^{high} TME mice and TGF- β^{low} TME mice injected with activated F5 T cells led to a better control of the tumor growth in TGF- β^{low} TME mice than in TGF- β^{high} TME mice (Figure S1C, Figure 1A). Strikingly, 3 weeks after the implantation, the analysis of the tumor composition revealed a majority of weak immunogenic cells in TGF- β^{high} TME mice, whereas the cancer cell ratio remained 50:50 in tumor developing in TGF- β^{low} TME animal (Figure 1B-D). Hence, this observation suggests that TGF- β in the TME prevents the elimination of weakly immunogenic cancer cells by the CTL. In line with this observation, contrary to control animals, in TGF- β^{low} TME mice tumor growth was more impaired and this irrelevant of the immunogenicity of the cancer cells (figure 1E). This the tumor growth impairment was associated with exacerbated cytotoxic functions of infiltrating CD8 T cells compared to control animals irrelevant of the immunogenicity levels (Figure 1F-I). Of note, this differential of activation of F5 T cells between TGF- β^{low} TME and TGF- β^{high} TME was lost when F5 lymphocytes expressed a TGF- β R constitutive active (RCA) (Figure S2A,B). Hence, this first set of data revealed that activated TGF- β in the TME signals in infiltrating CD8 T cells to increase T cell activation threshold, giving a selective advantage to weak immunogenic cancer cells in the tumor.

TGF- β signaling promotes LCK inactive conformation

The weaker ability of CD8 T cells to respond to weak cancer cell antigens in presence of TGF- β strongly suggest that that TGF- β signaling could alter TCR signaling. This

assumption was strengthened by the fact that we failed to observe any significant difference in the surface expression levels of the co-stimulatory molecules CD28, CTLA-4, ICOS and phosphatases CD45 and CD5 between F5 lymphocytes responding or not to TGF- β signaling (Figure S3). Hence, we focused our attention on early TCR signaling molecules, which respond to TCR engagement and particularly the SRC kinase LCK whose activation is known to be tightly controlled by conformational changes mainly relying on phosphorylation and dephosphorylation on two regulatory tyrosine residues Y505 and Y394^{19,20}. Phosphorylation of LCK on Y505 leads to its inactivation and on Y394 promotes a conformation modification that activates its kinase activity^{19,20}. In TGF- β^{high} TME mice, the ratio Y505/Y394 was in favor of the LCK inactivation in CD8 T cells infiltrating weak immunogenic cancer cells. In clear contrast, the active form of LCK was prevalent in CD8 T cells colonizing the TGF- β^{low} TME (Figure 2A,B). Similar observations were made in mice bearing a 50:50 ratio (strong:weak) (Figure S4A,B) Confirming a role for TGF- β signaling on the impairment of LCK activation, we found that the stimulation of purified wild type CD8 T cells with TGF- β 1 was sufficient to shift the LCK conformation ratio in favor of the inactive state (Figure 2C,D). Of note, this differential of LCK conformation was lost when F5 lymphocytes expressed a TGF- β R constitutive active (RCA) (Figure S2C,D)

Given that TGF- β can signal through different pathways^{14,15}, we next analyzed which branch of the signaling was involved in the increase of the levels of LCK inactive form. Because we failed to find any difference between wild type F5 T cells and F5 T cells deprived of both SMAD4 and TRIM 33 (Data not shown). We thus focused our attention on the non-canonical branch, known to involve P38 MAPK²¹. Fresh melanoma tumor section from CD45.1 C56BL6 mice were ex vivo cultured in the presence of activated F5 T CD45.2^{pos} cells previously treated with P38 MAPK inhibitor (P38MAPKi) (Figure S5A). Without treatment F5 T cells expressed a high level of inactive form of LCK. Strikingly, P38MAPKi treatment was sufficient to led to

an strong decrease of LCK inactivated form (Figure 2E, F) Hence TGF- β signaling, through its non-canonical branch interacts with the early step of TCR signaling, favorizing a higher number of LCK molecules under their inactive form and thus increasing the threshold of activation of the TCR.

TGF- β signaling promotes activation of FAK a stabilizer of CSK promoting LCK inactivation in CD8 T cells

Given that LCK activation is tightly regulated by the protein kinase CSK which is responsible of the phosphorylation of LCK on Y505²², we next assessed for the effect of TGF- β on CSK expression. In line with the increase in pY505 LCK in CD8 T cells infiltrating TGF- β^{high} TME, we observed higher expression levels of CSK in these cells compared to those colonizing TGF- β^{low} TME. (Figure 3A, B). This observation was confirmed on CD8 T cells either deprived of TGF- β signaling or over activating this pathways (Figure 3C, D). Because we observed that *csk* mRNA expression remained constant independently of TGF- β signaling (data not shown), we then searched for CSK interacting proteins induced upon TGF- β signaling that could increase its stability. The Focal Adhesion Kinase (FAK) have been reported to stabilize CSK by maintaining the protein close to the plasma membrane²³. In addition, TGF- β signaling, through its non-canonical branch is known to promote FAK activation associated with its phosphorylation on Y397²⁴⁻²⁶. We thus assessed whether activated TGF- β of the TME could promote FAK activation in CD8 T cells. Strikingly the activated form of FAK was 1.5 to twice higher in CD8 T cells infiltrating the TGF- β^{high} TME compared to TGF- β^{low} TME (Figure 4A, B). Confirming the role of TGF- β signaling we failed to find any difference in FAK activation between TGF- β^{high} TME and TGF- β^{low} TME when CD8 T cells expressed TGF- β RCA (Figure 4C, D). Moreover, the addition of TGF β 1 on wild type CD8 T cells was sufficient

to increase the active form of FAK. (Figure 4E, F) and F5 cells expressing a constitutive active form of TGF β RI (RCA) exhibited higher levels of activated FAK (Figure 4G, H). Thus TGF- β signaling in the TME active FAK, a stabilizer of CSK in infiltrating CD8 T cells.

Because the aforementioned data imply that TGF- β 1 could modify the LCK conformation through the activation of FAK, we next monitored the effects of a FAK inhibitor (FAKi) on the ability of TGF- β to promote LCK inactivation. Fresh tumor slides were maintained in culture in the presence of either TGF- β 1 or TGF β 1 and FAKi (Figure S5B). The inactivation of FAK was sufficient to block the ability of TGF- β 1 to promote the inactive form of LCK (pY505) and decrease its ability to repress the active form of LCK (pY394) in CD8 T cells infiltrating the tumors (Figure 4I, J). The TGF- β 1 inhibition is acting on the ratio of inactive/active form (Y505/Y394) of LCK, but this inhibition is more due to the effect on Y505 than Y394.

Hence, TGF- β signaling promotes the activation of FAK, which allows CSK stability promotes the increase of LCK inactive conformation in CD8 T cells.

TGF- β signaling pre-condition CD8 T cells to response to the TCR engagement

Finally, the over activation of CTL irrelevant of the strength of the peptide bared by cancer cells suggested that TGF- β signaling could control the TCR tonic tickling known to precondition T cells to efficiently response once their TCR is specifically engaged²⁷. In agreement with this assumption, we observed that F5 T cells which received permanent strong TGF- β signaling, due to the expression of a constitutively active TGF- β R, exhibited an increase of LCK inactive conformation prior any TCR engagement (Figure 5A, B). In contrast, the active conformation of LCK was predominant in F5 T cells escaping TGF- β signaling controls (RKO). In line, with the ability of activated LCK to favor TCR clusters in the plasma membrane²⁸⁻³⁴, we observed TCR capping in naïve F5 T cells escaping TGF- β control in association with the

active form of LCK reminding memory cells (Figure 5C-E). In addition to the TCR capping and the LCK activation, we observed that signalization downstream the TCR signaling was functional in the absence of TGF- β control and cognate TCR engagement (Figure 5F, G). Hence, TGF- β prevents T cells from pre-activating their TCR signaling prior the TCR engagement with the cognate peptide increasing the threshold of activation of the TCR required to get fully activated.

Discussion

The action of CD8 T cells in the TME is regarded as essential to eliminate cancer cells and control tumor progression. In this study, we demonstrated that TGF- β present in the TME plays a CD8 T cell-intrinsic role by affecting the TCR activation threshold. TGF- β signaling contribute to move LCK phosphorylation equilibrium towards its inactive conformation. This unbalance of LCK conformation is due to the ability of TGF- β signaling to activate FAK which stabilizes CSK a negative regulator of LCK activation. As a consequence of this, once TGF- β signaling is kept in check, LCK is more under its active conformation, favorizing TCR signaling pre-activation, and thus response to weaker antigen stimulation. Hence CD8 T cells escaping TGF- β can efficiently eliminate cancer cells weakly immunogenic. At the opposite TGF- β signaling, the TCR activation condition should be stronger and CD8 T cells only respond to high immunogenic cancer cells. Hence, TGF- β signaling in CD8 T cells contribute to the tumor immune escape, by promoting survival advantages to weak immunogenic cancer cells.

A link between TCR signaling and TGF- β signaling has been previously established. Indeed, after TCR engagement by cognate MHC-peptide complexes, the TGF- β signaling pathway has been shown to be altered. In contrast to weak TCR signaling, strong TCR signaling reduces TGF- β signaling by down-regulating TGF- β RI, at both mRNA and protein levels,

through the activation of CARD-11 and NF κ B³⁵. Hence, the strength of the TCR stimulation determines the inhibitory effects of TGF- β on T cells. The present study reports TGF- β signaling also influence the intensity of the TCR response. Hence, we propose a crosstalk between TCR signaling and TGF- β signaling in T cells that is at the core of the CTL ability to efficiently eliminate all cancer cells. High levels of TGF- β have been proposed to sustain TGF- β RI expression³⁵, which will lead to the increase of TCR signaling activation threshold. This potent repressive mechanism is of importance in TGF- β highly enriched such as tumors, but also in immune-privilege sites, where T cell responses is largely impaired such as the eye, the placenta, the testis^{36,37}. Rupture of this tightly tuned equilibrium between the two pathways can be of major consequences favorising tumor elimination but also promoting autoimmunity. Indeed, deprivation of TGF- β signaling in T cells is sufficient to lead to fatal early onset autoimmunity touching all the organs^{38,39}. IL-6 has been proposed to prevent the ability of TGF- β to sustain TGF- β RI cell surface expression in response to strong TCR stimuli in vitro³⁵. Whether the presence of IL-6 in the TME can repress TCR activation threshold should be addressed. However, in vivo IL-6 has been showed to have direct effects on epithelial cells and promote the transformation⁴⁰ excluding a potential therapeutic approach with IL-6.

TCR engagement leads to a tyrosine kinase cascade and ubiquitin-dependent signal termination⁴¹. The TCR has no intrinsic catalytic activity but forms a multisubunit complex with CD3, in which some of them have long cytoplasmic domains that contain ITAMs. The precise mechanism by which TCR engagement initiates ITAM phosphorylation is not clear, but might simply involve the local exclusion of phosphatases, such as CD45⁴². The Src family kinase LCK phosphorylates the ITAMs and under conditions of TCR ligation can rapidly initiate ITAM phosphorylation⁴³. Previous work showed that LCK plays an important role in regulating autoimmunity since it has been described that specific deficiency of this kinase in T cells of patients with type 1 diabetes⁴⁴ as well as an important role in the CTL function of CD8⁺

T cells in mice⁴⁵. CSK was shown to have a key role in regulation TCR activation⁴⁶ suggesting a tight proximal control of the TCR pathway through phosphorylation of LCK on inhibiting tyrosine Y505. We show that FAK, a key stabilizer of CSK to the plasma membrane²³ is activated by TGF- β signaling in CD8 T cells. Similar link between FAK activation and TGF- β signaling have been depicted in epithelial cells particularly during the Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) involving the non-canonical branch of TGF- β signaling²⁴⁻²⁶. Hence, the FAK activation of by TGF- β seems playing a direct role on both the cancer cells and on CD8 T cells in the TME to promote cancer progression. Whether FAK inhibitors used in clinics contribute to increase the sensitivity of CD8 T cells to weak immunogenic cancer cells remains to be addressed

In sum this study reveals an unsuspected cross talk between TGF- β signaling and TCR signaling with direct consequences on the CD8 T cells ability to eliminate weak immunogenic tumors. Moreover, it provides evidence that targeting TGF- β /TGF- β signaling in the TME could constitute a promising approach to fully eliminate cancer cells even those with a weak immunogenicity.

Materials and Methods:

Mice:

CD4-Cre; TGF β 2^{fl/fl} mice and *CD4-Cre; STOP^{flx/flx} tgfb1^{CA}* mice, described previously^{38,47}, were bred with F5 TCR transgenic mice (which express V α 4 and V β 11 chains¹⁷) that express a TCR recognizing a H2-D^b MHC molecule restricted to A/NT/60/68 influenza virus (amino acids 366-374) nucleoprotein (NP) epitope (NP68)¹⁷, generously gifted by Dr Kioussis (London, UK)¹⁷. F5 *CD4-Cre; TGF β 2^{fl/fl}* mice (TGF β ^{KO}) and F5 *CD4-Cre; STOP^{fl/fl}-TGF β 1^{CA}* (TGF β ^{CA}) and F5 (TGF β ^{WT}) mice were further crossed onto *Rag2^{KO}* background. *FOXP3-Cre^{eYFP}; Itg β 8^{wt}* (TGF-

$\beta^{\text{High-TME}}$ mice *FOXP3-Cre^{eYFP} ;Itg β 8^{fl/fl}* ($\text{TGF-}\beta^{\text{Low-TME}}$) mice were previously described⁴⁸. CD45.1 C57BL/6 mice were purchased from Charles River Animals were euthanized with euthanasia automate (Tem Segal) using 50-100% CO₂. All animals were between 2 and 8 months of age, all on the C57BL/6J background. Both genders were used without any differences between males and females and no difference in age was observed. All mice were maintained in Anican/P-PAC, a specific pathogen-free animal facility of the CRCL, Lyon, France, in stable temperature between 19-23°C and 60-65% of hygrometry under a 12-h dark light cycle.

Ethics. Experiments on mice were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union, ARRIVE guideline, and French laws and were validated by local Animal Ethics Committee (CECCAPP) and the French ministry of Research (#9239 and #19584).

Peptide and inhibitors and TGF- β 1:

The cognate influenza peptide NP68 (amino acid 366-374, sequence: ASNENMDAM)⁴⁹ was purchased from Think-peptides (UK), and had greater than 98% purity and was solubilized in PBS (Invitrogen). P38MAPK inhibitor was purchased from biotechne (SB203580) and used at a final concentration of 1 mM. Fak inhibitor (PND-1186 MedChem Express) was used at 50nM. Recombinant TGF- β 1 (Miltenyi Biotec, 130-095-066) was used at 10ng/ml.

Cell lines:

B16F10 (B16) is a melanoma cell line derived from B6 mice (ATCC number CRL-6475). The generation of B16 NP68 (strongly immunogenic) and B16NP3R (Weakly immunogenic)¹⁸ was done using retroviral approach. Briefly Retroviral vectors was generated after transfection of Plat-E cells with plasmids *pQCIRESPuroEGFPNP68* or *pQCIRESPuromRuby2NP3R* (which was generated by GenScript company). B16 cells were infected with viral particules using polybrene (Sigma, H9268) and selected on puromycin 1 mg/ml (Sigma, P8833-10MG). All cell

lines were maintained in DMEM (Gibco, 31966-021) supplemented with 10% FCS (LifeTechnologies, 10270-106), 1% HEPES (LifeTechnologies, 15630-056), 1% penicillin/streptomycin (LifeTechnologies, 15140-122). 2mg/ml of puromycin (Sigma, P8833-10MG) were added for B16-NP68 expressing GFP and B16-NP3R expressing the mRuby2 fluorescent protein. All cell lines were tested negative for mouse pathogens, including mycoplasma by PRIA test (Charles River).

Tumor implantation and tissue preparation.

In total, 5×10^5 B16 cells were injected intra-dermally (i.d) in the back skin. Tumor growth was monitored every 3 days with a caliper in a double-bind manner. Tumor size (mm^3) was calculated as width x length x width. Tumors were minced with scalpel, and digested with 1 mg/ml collagenase IV (Sigma, C26741G) and DNase I at 1 mg/ml (Sigma, 11284932001) in DMEM 5REF supplemented with 1% FCS (LifeTechnologies, 10270-106) and 1% HEPES (LifeTechnologies, 15630-056).

For ex-vivo part, fresh tumors were treated in the Ex-vivo facility-specific matrix gel © and cut at 250 μm with microtome (Seica). Tumor slides were then cultured on Uvac 1264 in RPMO-completed medium, 1% FCS, 1% HEPES, 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM-NEAA (LifeTechnologies), 1% NaPyruvate (LifeTechnologies), with Fak inhibitor or/with human active recombinant TGF- β 1. Tumor slices were harvested 24 h later, minced with scalpel, and incubated with 5mg/ml collagenase IV (Gibco) and 1 mg/ml DNase I (Sigma, 11284932001) in RPMI supplemented with 1% FCS and 1% HEPES for 30 min at 37° C with agitation prior cytometer analysis.

Antibodies and flow cytometry analysis

Surface staining was performed using the following fluorescent-conjugated antibodies: CD3 ϵ 1/200 (145-2C11; BD biosciences; 564378), CD3 17A2 (BD biosciences 740530), CD8 β 1/200

(53-5.8; BD; 740843), CD8 α 1/200 (53.6.7; BD; 563234/ Biolegend ; 100748), CD45 1/200 (30-F11; eBiosciences; 56-0451-82), CD45.2 1/100 (104 ;BD ;560697), CD107a 1/100 (1D4B ; BD ; 550648), v β 11 1/100 (RR3-15 ;BD ;553197). For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized using fixation and permeabilization buffer kit (00-5523-00, e Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Granzyme B 1/100 (GRB05 Invitrogen) were used. For cytokine staining cells were incubated with 1 μ g/ml, PMA 1 μ g/ml ionomycin (both from Sigma-Aldrich) and Brefeldin A and GolgiStop (eBioscience), for four hours. IFN- γ 1/100 (XMG1.2 BD bioscience) TNF- α 1/100 (MP6-XT22, BD) staining was performed with Buffer kit (00-5523-00, eBiosciences). Cells were stained with p-LCK Y394 (Pe, BioLegend ;933104). p-LCK Y505 (Cell signaling; 2751S), p-FAK Y397 (LifeTechnologies ; 44-624G), CSK (C74C1 ;Cell Signaling ;4980S) and they was detected with goat anti-rabbit A488 1/100 (LifeTechnologies, A11034) or goat anti-rabbit A647 (LifeTechnologies A31573) . All samples were acquired on BD Fortessa and data analyzed with FlowJo Software Version X.

Western Blot

For Western blot analysis, 30 μ g of protein was loaded on the gel, then separated by 12% SDS-PAGE (Biorad), and transferred to a Hybond nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech) or PVDF membrane (Biorad). After transfer, the immunoblots were blocked by incubating with 5% BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20. Next, the blots were probed overnight with the appropriate dilution of the primary antibodies anti-LCK from Cell signaling (2752), anti-pSrc pY416 from Cell signaling (210S) which recognizes LCK on pY394, anti-pLCK pY505 from Cell signaling (2751S), anti-CSK (sc-166560 Santa Cruz/4980S Cell signaling) anti-pFAK Y397 (LifeTechnologies ; 44-624G)HRP-conjugated anti-rabbit antibodies (Cell signaling 7074S), HRP anti- β actin (Abcam ab49900) for 1 h at

room temperature. After washing, the blots were developed using the ECL chemiluminescence method (Sigma WBLUC0500).

Immunofluorescence staining

Purified CD8 F5 T cells from F5 (TGF β R^{WT}) and F5 *CD4-Cre; TGF β R2^{fl/fl}* mice (TGF β R^{KO}) using MojoSort CD8 isolation kit were put on poly-L-lysine coated glass slides (Sigma, P0425-72EA) then fixed in 4% of PFA (FisherScientific, 114881745) and stained with CD8, v β 11 1/100 (RR3-15; BD ;553197), CD3, p-LCK Y394 (Cell signaling; 2101S). p-LCK Y394 was detected with goat anti-rabbit 1/100 (Life Technologie ; A31573). All slices were stained with DAPI (Eutomedex ;1050A) and mounted with Fluoromount (Sigma, F4680-25ml). All samples were acquired on LSM 800 inversed confocal microscope (Zeiss/Provenance).

Statistical analysis

P values were calculated with paired *t* test, unpaired Student *t* test, (GraphPad Prism) as specified in figure legends. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0,0001. Before using unpaired *t* test, a normality test was performed (Shapiro-Wilk normality test).

Acknowledgments:

The expert assistance of E Guillemot is highly appreciated. The authors thank Drs S M'Homa Soudja , H Hernandez Vargas and N Benech for their comments. . We thank C.B. Wilson, for *CD4-Cre*, D. Kioussis for F5 TCR transgenic mice. This work was supported by Labelisation ligue contre le Cancer EI-2016 (JCM) and ANR investissement d'avenir ANR-10-LABX-61 (JCM), OL was supported by la ligue contre le cancer . FC was supported by a MERT fellowship.

Author Contributions: OL, AH, FC and HT performed the experiments. OL and JCM designed the experiments. OL and JCM wrote the paper.

References

1. Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 267–296 (2007).
2. Thomas, D. A. & Massagué, J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**, 369–380 (2005).
3. Gorelik, L. & Flavell, R. A. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in T cells. *Nat. Med.* **7**, 1118–1122 (2001).
4. Kim, B.-G., Malek, E., Choi, S. H., Ignatz-Hoover, J. J. & Driscoll, J. J. Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **14**, 55 (2021).
5. Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2**, 401–404 (2012).
6. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, pl1 (2013).
7. Lainé, A. *et al.* Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin $\alpha\beta 8$ -mediated TGF- β activation. *Nat. Commun.* **12**, 6228 (2021).
8. Courau, T. *et al.* TGF- β and VEGF cooperatively control the immunotolerant tumor environment and the efficacy of cancer immunotherapies. *JCI Insight* **1**, e85974 (2016).
9. Donkor, M. K. *et al.* T cell surveillance of oncogene-induced prostate cancer is impeded by T cell-derived TGF- $\beta 1$ cytokine. *Immunity* **35**, 123–134 (2011).
10. Calon, A. *et al.* Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* **22**, 571–584 (2012).
11. Tauriello, D. V. F. *et al.* TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* **554**, 538–543 (2018).
12. Derynck, R., Turley, S. J. & Akhurst, R. J. TGF β biology in cancer progression and immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **18**, 9–34 (2021).
13. Travis, M. A. & Sheppard, D. TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 51–82 (2014).
14. Massagué, J. & Wotton, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* **19**, 1745–1754 (2000).
15. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
16. Riquelme, E., Carreño, L. J., González, P. A. & Kalergis, A. M. The duration of TCR/pMHC interactions regulates CTL effector function and tumor-killing capacity. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2259–2269 (2009).
17. Mamalaki, C. *et al.* Positive and negative selection in transgenic mice expressing a T-cell receptor specific for influenza nucleoprotein and endogenous superantigen. *Dev. Immunol.* **3**, 159–174 (1993).
18. Young, A. C., Zhang, W., Sacchettini, J. C. & Nathenson, S. G. The three-dimensional structure of H-2Db at 2.4 Å resolution: implications for antigen-determinant selection. *Cell* **76**, 39–50 (1994).
19. Boggon, T. J. & Eck, M. J. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* **23**, 7918–7927 (2004).
20. Yamaguchi, H. & Hendrickson, W. A. Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* **384**, 484–489 (1996).

21. Yu, L. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.* **21**, 3749–3759 (2002).
22. Schmedt, C. & Tarakhovsky, A. Autonomous maturation of alpha/beta T lineage cells in the absence of COOH-terminal Src kinase (Csk). *J. Exp. Med.* **193**, 815–826 (2001).
23. Chapman, N. M., Connolly, S. F., Reinl, E. L. & Houtman, J. C. D. Focal Adhesion Kinase Negatively Regulates Lck Function Downstream of the T Cell Antigen Receptor. *J. Immunol.* **191**, 6208–6221 (2013).
24. Wendt, M. K. & Schiemann, W. P. Therapeutic targeting of the focal adhesion complex prevents oncogenic TGF-beta signaling and metastasis. *Breast Cancer Res. BCR* **11**, R68 (2009).
25. Liu, J. *et al.* The role of focal adhesion kinase in transforming growth factor- β 2 induced migration of human lens epithelial cells. *Int. J. Mol. Med.* (2018) doi:10.3892/ijmm.2018.3912.
26. Yeung, V. *et al.* FAK Inhibition Attenuates Corneal Fibroblast Differentiation In Vitro. *Biomolecules* **11**, 1682 (2021).
27. Myers, D. R., Zikherman, J. & Roose, J. P. Tonic Signals: Why Do Lymphocytes Bother? *Trends Immunol.* **38**, 844–857 (2017).
28. Purtic, B., Pitcher, L. A., van Oers, N. S. C. & Wülfing, C. T cell receptor (TCR) clustering in the immunological synapse integrates TCR and costimulatory signaling in selected T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 2904–2909 (2005).
29. Burroughs, N. J., Lazic, Z. & van der Merwe, P. A. Ligand detection and discrimination by spatial relocalization: A kinase-phosphatase segregation model of TCR activation. *Biophys. J.* **91**, 1619–1629 (2006).
30. Davis, S. J. & van der Merwe, P. A. Lck and the nature of the T cell receptor trigger. *Trends Immunol.* **32**, 1–5 (2011).
31. Harder, T. & Kuhn, M. Selective Accumulation of Raft-Associated Membrane Protein Lat in T Cell Receptor Signaling Assemblies. *J. Cell Biol.* **151**, 199–208 (2000).
32. Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M. & Bolen, J. B. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**, 301–308 (1988).
33. Bachmann, M. F. *et al.* Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells. *J. Exp. Med.* **189**, 1521–1530 (1999).
34. Cawthon, A. G. & Alexander-Miller, M. A. Optimal colocalization of TCR and CD8 as a novel mechanism for the control of functional avidity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 3492–3498 (2002).
35. Tu, E. *et al.* T Cell Receptor-Regulated TGF- β Type I Receptor Expression Determines T Cell Quiescence and Activation. *Immunity* **48**, 745-759.e6 (2018).
36. Wahl, S. M., Wen, J. & Moutsopoulos, N. TGF- β : a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol. Rev.* **213**, 213–227 (2006).
37. Masli, S. & Vega, J. L. Ocular immune privilege sites. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **677**, 449–458 (2011).
38. Marie, J. C., Liggitt, D. & Rudensky, A. Y. Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor. *Immunity* **25**, 441–454 (2006).

39. Li, M. O., Sanjabi, S. & Flavell, R. A. Transforming Growth Factor- β Controls Development, Homeostasis, and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms. *Immunity* **25**, 455–471 (2006).
40. Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A. & Bhatt, A. N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**, 11553–11572 (2016).
41. Dustin, M. L. & Depoil, D. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 672–684 (2011).
42. Graf, B., Bushnell, T. & Miller, J. LFA-1-mediated T cell costimulation through increased localization of TCR/class II complexes to the central supramolecular activation cluster and exclusion of CD45 from the immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 1616–1624 (2007).
43. Nika, K. *et al.* Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* **32**, 766–777 (2010).
44. Nervi, S. *et al.* Specific deficiency of p56lck expression in T lymphocytes from type 1 diabetic patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165**, 5874–5883 (2000).
45. Milstein, O. *et al.* CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition. *Blood* **117**, 1042–1052 (2011).
46. Borger, J. G., Filby, A. & Zamoyska, R. Differential Polarization of C-Terminal Src Kinase between Naive and Antigen-Experienced CD8+ T Cells. *J. Immunol.* **190**, 3089–3099 (2013).
47. Bartholin, L. *et al.* Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the TbetaRI/ALK5 receptor. *Genes. N. Y. N 2000* **46**, 724–731 (2008).
48. Worthington, J. J. *et al.* Integrin $\alpha\beta 8$ -Mediated TGF- β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* **42**, 903–915 (2015).
49. Smyth, L. A. *et al.* Altered peptide ligands induce quantitatively but not qualitatively different intracellular signals in primary thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8193–8198 (1998).

Figure legends

Figure. 1: TGF- β prevents elimination of weak immunogenic cancer cells by CTL

A-C Activated F5 T cells from F5RagKO mice immunized with NP68 were adoptively transplanted in TGF- β^{Low} TME mice and their littermate controls (TGF- β^{High} TME) which were i.d. injected 5 days after tumor implantation with a 50:50 ratio of B16 cells expressing NP68 (strong):NP3R(weak) peptide. **A**. Schematic representation of experimental plan. **B** Representative graph illustrating the size of the tumors at different days post-implantation. n = 11 mice per group, data representative of two independent experiments. **C, D** Flow cytometry analysis of tumors 19 days after tumor implantation. Counter plots illustrate the ratio Strong: Weak of B16 cells. **D**, Histograms demonstrate the ratio of Strong: Weak of B16 cells n=6 mice per group, data are representative of two individual experiments. **E-I** Activated F5 T cells from F5RagKO mice immunized with NP68 were adoptively transplanted in TGF- β^{Low} TME mice and their littermate controls (TGF- β^{High} TME) which were i.d. injected 5 days after tumor implantation with B16 cells expressing either NP68 (strong) or NP3R (weak) peptide. **E** Representative graphs illustrating the size of the tumors at different days post-injection. n = 8 mice per group, data representative of three independent experiments. **F-I** Flow cytometry analysis of the CD8 F5 T cells (V β 11^{pos}) from the tumor 19 days post tumor implantation. **F** Counterplots illustrate granzyme B (GzB) and CD107 expression. **G** Histogram demonstrate the percentage of F5 T cells expressing GzB. **H** Counterplots illustrate IFN γ and TNF α expression **I** Histograms demonstrate the percentage IFN γ or IFN γ and TNF α double positive cells. n = 7 to 13 mice per group from two or three independent experiments. ns statistically not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ were determined by unpaired two-tailed Student *t* test.

Figure 2: LCK activation is controlled by TGF- β signaling

A-B Activated F5 T cells from F5RagKO mice immunized with NP68 were adoptively transplanted in TGF- β^{Low} TME mice and their littermate controls (TGF- β^{High} TME) which were i.d. injected 5 days after implantation with B16 cells expressing either NP68 (strong) or pNP3R (weak) peptide. 19 days after tumor implantation, F5 T cells (Vb11) from the tumors were analyzed by flow cytometry. **A** Representative histograms of the levels of phosphorylated LCK in its inactive form (P-LCK Y505) or active form (P-LCK Y394) percentage and MFI are mentioned. **B** Graph illustrates the ratio of MFI P-LCK Y505/ P-LCK Y394. $n = 6$ mice (strong), $n=8$ mice (weak). Data representative of two independent experiments. **C-D**. CD8 T cells isolated from the spleen and lymph nodes of CD57BL/6 were treated with TGF- β 1 or not for 30 min. **C** representative immunoblotting for total LCK, active LCK (P-LCK Y394) and inactive LCK (P-LCK Y505). **D** Graphs illustrate the ratio P-LCK Y505 or P-LCK Y394 on LCK in presence of TGF β 1 or PBS. Data are representatives of three independent experiments. **E, F** Activated F5 T cells from F5RagKO mice immunized with NP68 were treated or not with P38MAPKi and put on alive slices of fresh B16 tumors, expressing cognate antigen for F5 TCR, from CD45.1CD57BL/6 mice. 24h later F5 CD8 T cells were analyzed by flow cytometry. **E** Representative histograms of the percentage and MFI of inactive LCK (P-LCK Y505) in F5 cells/ MFI and percentages are indicated. Graph illustrates the percentage and the MFI of F5 CD8^{pos} T cells. $n = 4$ slices for each group. ns statistically not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, were determined by unpaired two-tailed Student t test.

Figure 3: Increased levels of CSK in CD8 T cells by TGF- β signaling

A-B Activated F5 T cells from F5RagKO mice immunized with NP68 were adoptively transplanted in TGF- β^{Low} TME mice and their littermate controls (TGF- β^{High} TME) which were i.d. injected 5 days after tumor implantation with B16 cells expressing either NP68 (strong) or pNP3R (weak) peptide. 19 days after tumor implantation, F5 T cells (Vb11) from the tumors were analyzed by flow cytometry. **A** Representative histogram of the percentage and MFI of CSK. **B** Graphs illustrate the percentage and MFI for CSK. $n = 7/8$ or 4 mice per group. Data representative of three independent experiments. **C, D.** F5 T cells from TGF- $\beta\text{RII}^{\text{Ctrl}}$ (RWT), TGF- $\beta\text{R}^{\text{CA}}$ (RCA), TGF- $\beta\text{RII}^{\text{KO}}$ (RKO) mice were immunoblotting for CSK. Graph illustrate the normalized ratio of CSK on β -actin. $n = 3$. Data are representative of three independent experiments. for b, ns statistically not significant. $*P < 0.05$, $*** P < 0.001$, were determined by unpaired two-tailed Student t test. For d ns statistically not significant. $*P < 0.05$ were determined by paired two-tailed t test.

Figure 4: TGF- β signaling promotes activation of FAK in CD8 T cells

A-D Activated F5 T cells from F5RagKO or F5 RagKo RCA mice immunized with NP68 were adoptively transplanted in TGF- β^{Low} TME mice and their littermate controls (TGF- β^{High} TME) which were i.d. injected 5 days after tumor implantation with B16 cells expressing either NP68 (strong) or NP3R (weak) peptide. 19 days after tumor implantation, F5 T cells (Vb11) from the tumors were analyzed by flow cytometry. **A and C** Histograms illustrate FAK activation (P-FAK Y397). MFI and percentage are illustrated. **B and D** graphs demonstrates the MFI of cctivated FAK $n = 8/9$ or 5 mice per group, data representative of two/three independent experiments. **E-F** CD8 $^{\text{pos}}$ T cells from C57BL/6 mice were isolated and treated with or without TGF- β 1 for 30 min before being analyzed by western blot for P-FAK Y397. Graph illustrates the ratio of active FAK on β -actin. $n = 3$. Data representative of three independent experiments. **G-H.** F5 T cells

from RWT, RCA, RKO mice, were immunoblotting for active FAK (P-FAK Y397) or β -actin. Graph illustrate the normalized ratio of FAK Y397 on β -actin. n = 3. Data representative of three independents experiments. **II.** Fresh serial sections of B16 melanoma from C57BL/6 mice were treated with TGF- β 1 in the presence or not of FAKI illustrated in Fig S5B. CD8 T cells were analyzed 24hours later. **I** Representative histograms of inactive LCK (P-LCK Y505) and active LCK (P-LCK Y394). Percentage and MFI are illustrated. **J** Graph illustrates the percentage of cell positive for P-LCK Y505, P-LCK Y394 or the ratio P-LCK Y505 /Y394. n = 5 or 6 for each group. Data representative of two independents experiments. For b,d ns statistically not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, were determined by unpaired two-tailed Student *t* test. For f,h,g ns statistically not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, were determined by paired two-tailed *t* test.

Figure. 5: Preconditioning of CD8 T cells to response to the TCR engagement in the absence of TGF- β signaling control

A, B. F5 CD8 T cells from RWT mice , RCA mice, or RKO mice, were immunoblotting for LCK, active LCK (P-LCK Y394), inactive LCK (P-LCK Y505). Graph illustrate the ratio of active on inactive form. n = 3. Data representative of three independents experiments.**C-E.** F5 CD8 T cells from RWT mice, RCA mice, or RKO mice, were analyzed by confocal microscopy immunofluorescence for TCR (V β 11), P-LCK Y394 CD8 **E**,Graph illustrates the percentage of colocalization of active LCK and TCR. 10-15 cells were analyzed for each conditions. **F-G** F5 CD8 T cells from RWT mice or RKO mice were nalalyzed by flow cytometry. Graph illustrates phospho p65 (NF- κ B sub-unit) expression levels. MFI are illustrated. Graph illustrates the percentage and n = 4 mice per group, datas are representative of two independents experiment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, were determined by unpaired two-tailed Student *t* test.

Supplementary figure legends

Sup Fig. 1. Similar Growth of B16 NP68 and B16 NP3R and control of ratio 50:50

A C57BL/6 mice were i.d injected with B16 cells expressing strong or weak antigen. Representative graphs illustrating the size of the tumors at different days post-injection **B.** CD3^{KO} mice were i.d injected with a 50:50 ratio of B16 cells expressing strong or weak antigen for F5 TCR. 19 days later the composition of the tumor was analyzed by flow cytometry. Counter plots illustrate the percentage of B16 cells from each clones before and after tumor implantation. **C** Illustration of the 50:50 ratio injected in figure 1 A

Sup Fig. 2. TGF- β signaling lead to decrease cytotoxic response due to the maintain of LCK in inactive conformation

Activated F5 T cells from F5 RagKo RCA mice immunized with NP68 were adoptively transplanted in TGF- β ^{Low}TME mice and their littermate controls (TGF- β ^{High}TME) which were i.d. injected 5days after tumor implantation with B16 cells expressing either NP68 (strong) or NP3R (weak) peptide. **A-B** Flow cytometry analysis of the CD8 F5 T cells (V β 11^{pos}) from the tumor 19 days post tumor implantation. **A** Counterplots illustrate granzyme B (GzB) and CD107 expression or IFN γ and TNF α expression. **B** Histogram demonstrate the percentage of F5 T cells expressing GzB or GzB and CD107a double positive or FN γ or IFN γ and TNF α double positive cells. n=3 to 8 mice per group from two or three independent experiments.

H Counterplots illustrate IFN γ and TNF α expression **I** Histograms demonstrate the percentage of IFN γ or IFN γ and TNF α double positive cells . n = 3 to 8 mice per group from two or three independent experiments. **C.** Representative histograms of the levels of phosphorylated LCK

in is inactive form (P-LCK Y505) percentage and MFI are mentioned. D Graph illustrate the percentage or the MFI P-LCK Y505. n= 3 to 4 mice per group from two independents experiments. ns statistically not significant were determined by unpaired two-tailed Student *t* test.

Sup Fig. 3. TGF- β does not impact amount of accessory molecules of T cells signaling.

F5 CD8 T cells from RWT mice, RCA mice, or RKO mice, were analyzed by cytometry for CD28, CTLA4, ICOS, CD45RB, CD45RA and CD5.

Sup Fig. 4. TGF- β signaling increase LCK inactive conformation

Activated F5 T cells from F5RagKO mice immunized with NP68 were adoptively transplanted in TGF- β^{Low} TME mice and their littermate controls (TGF- β^{High} TME) which were i.d. injected 5 days after tumor implantation with a 50:50 ratio of B16 cells expressing NP68 (strong):NP3R(weak) peptide. A. Representative histograms of the levels of phosphorylated LCK in is inactive form (P-LCK Y505) percentage and MFI are mentioned. B Graph illustrate the percentage or the MFI P-LCK Y505. n = 4 mice per group. Data representative of two independents experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, were determined by paired two-tailed *t* test.

Sup Fig. 5. Schematic representation of ex-vivo experimental design.

Fresh serial section from tumor sample were maintained in culture conditions. **A.** Tumor was cultured 24h with T cells which was treated with TGF- β 1 or P38MAPK inhibitor. **B.** Tumor slice was treated with TGF- β 1 or TGF- β 1 + Fak inhibitor for 24h hours.

Figure 1 Labiad *et al.*

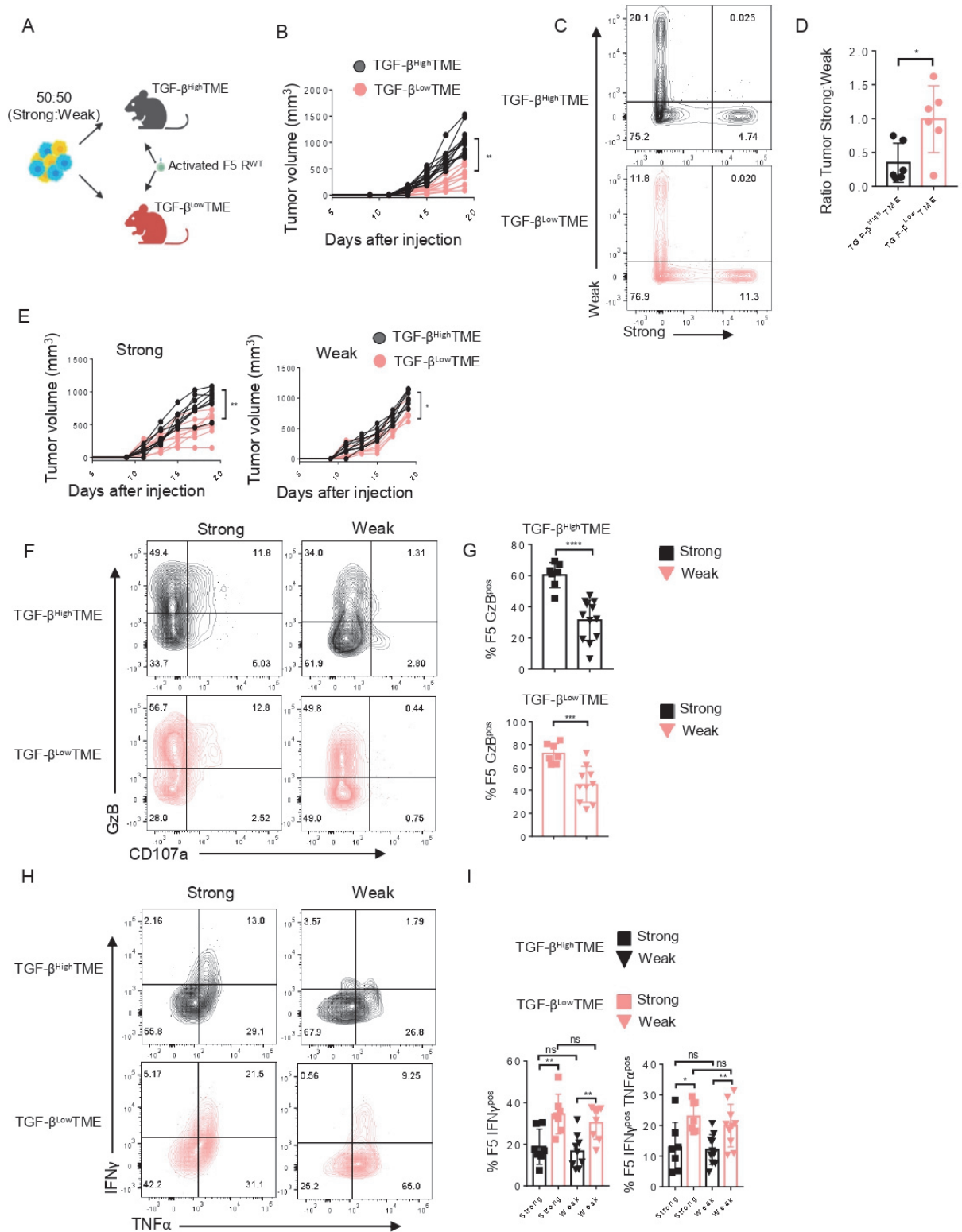
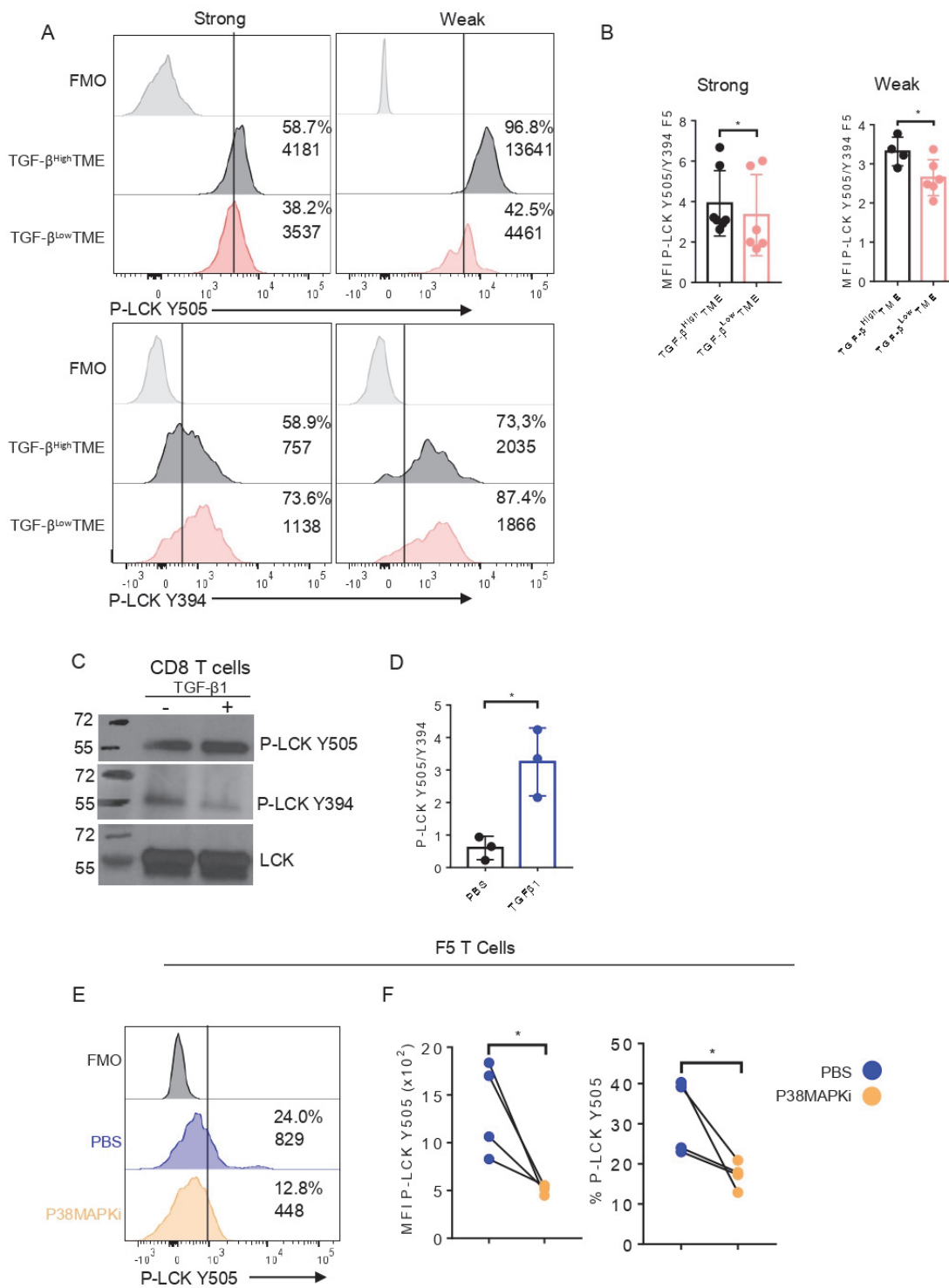


Figure 2 Labiad *et al.*



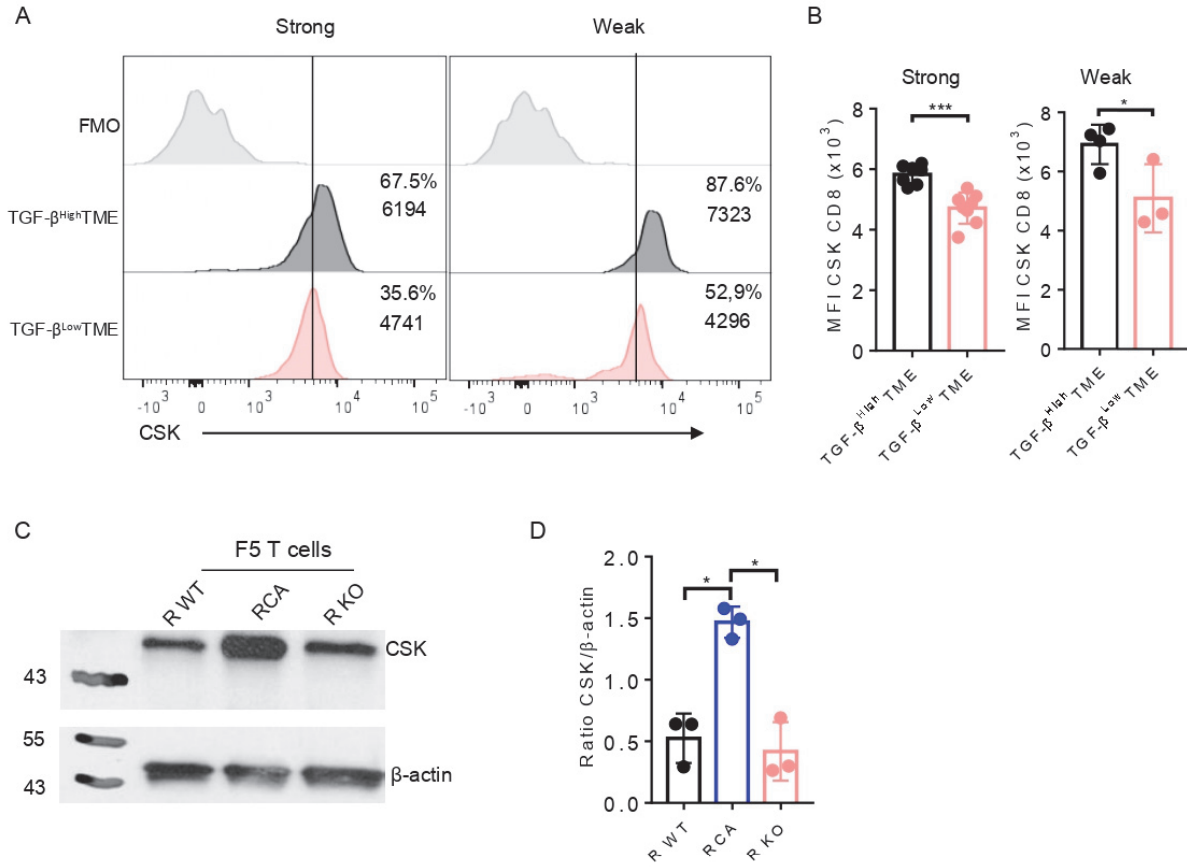
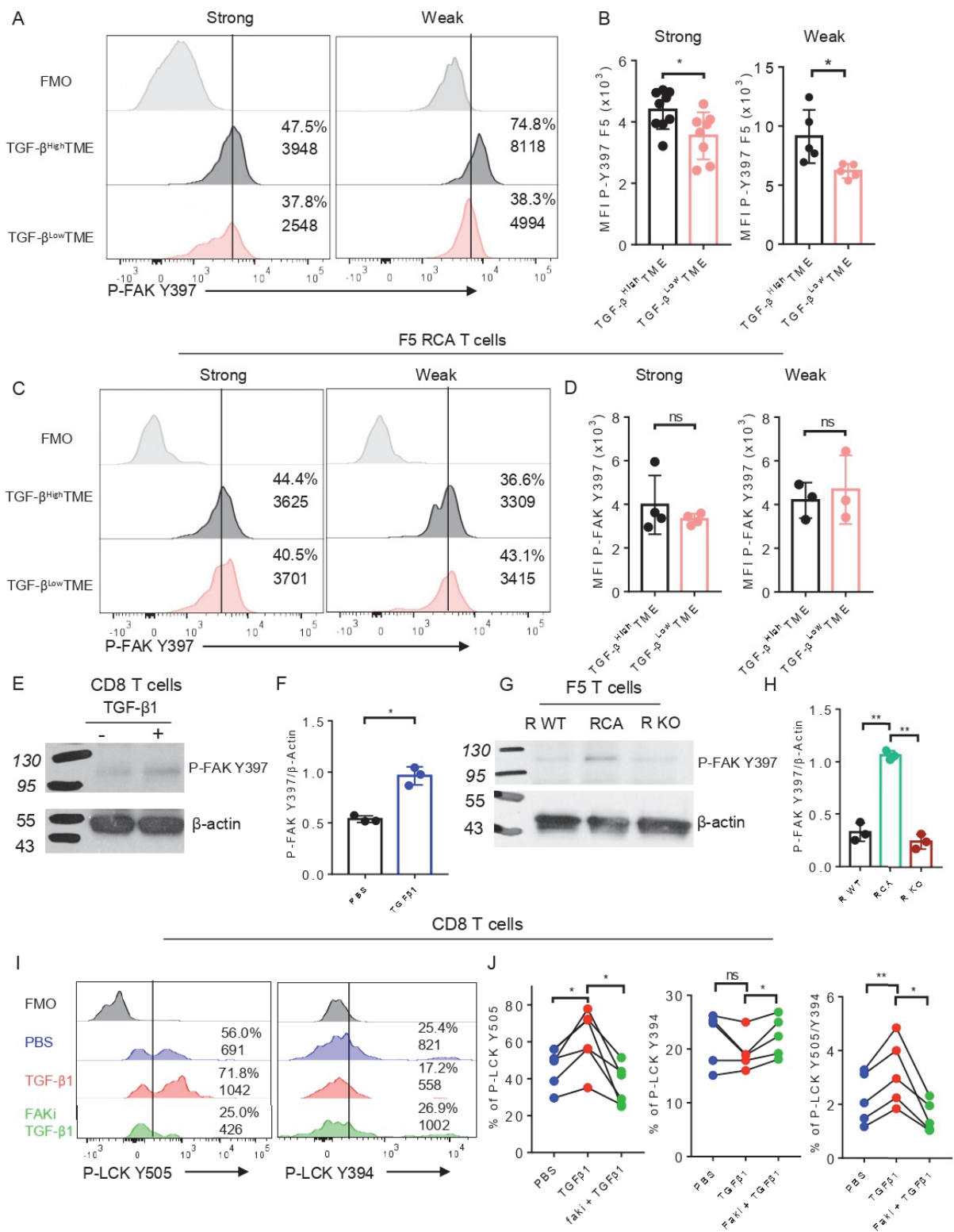
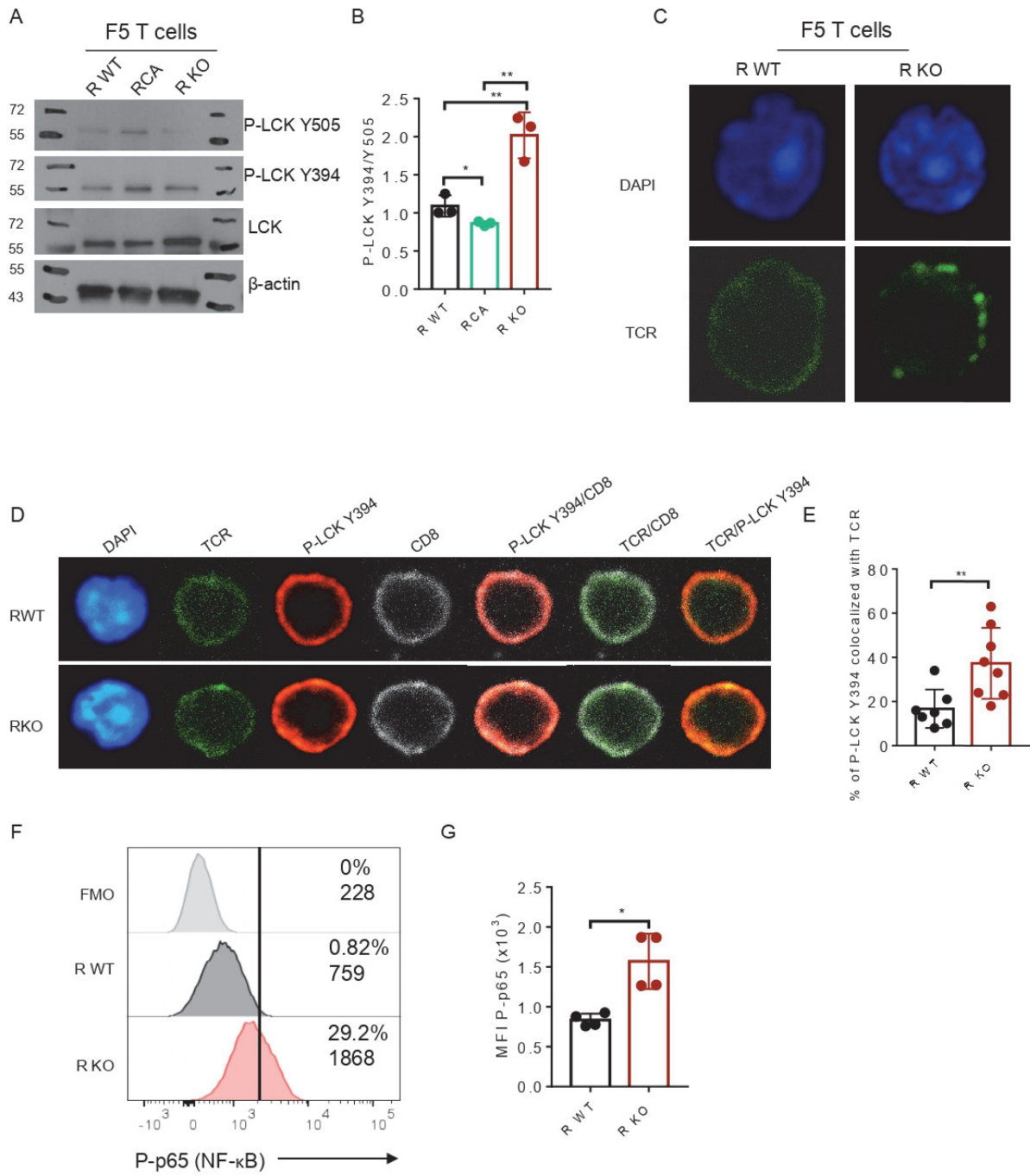
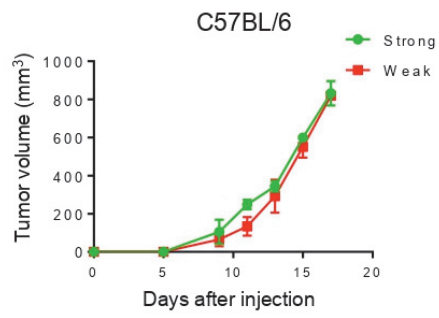


Figure 4 Labiad *et al.*



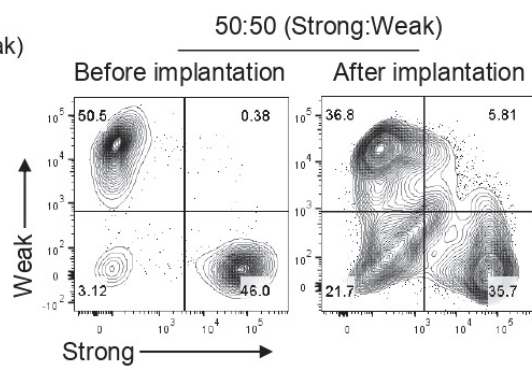


A

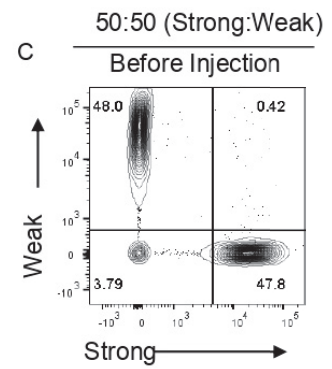


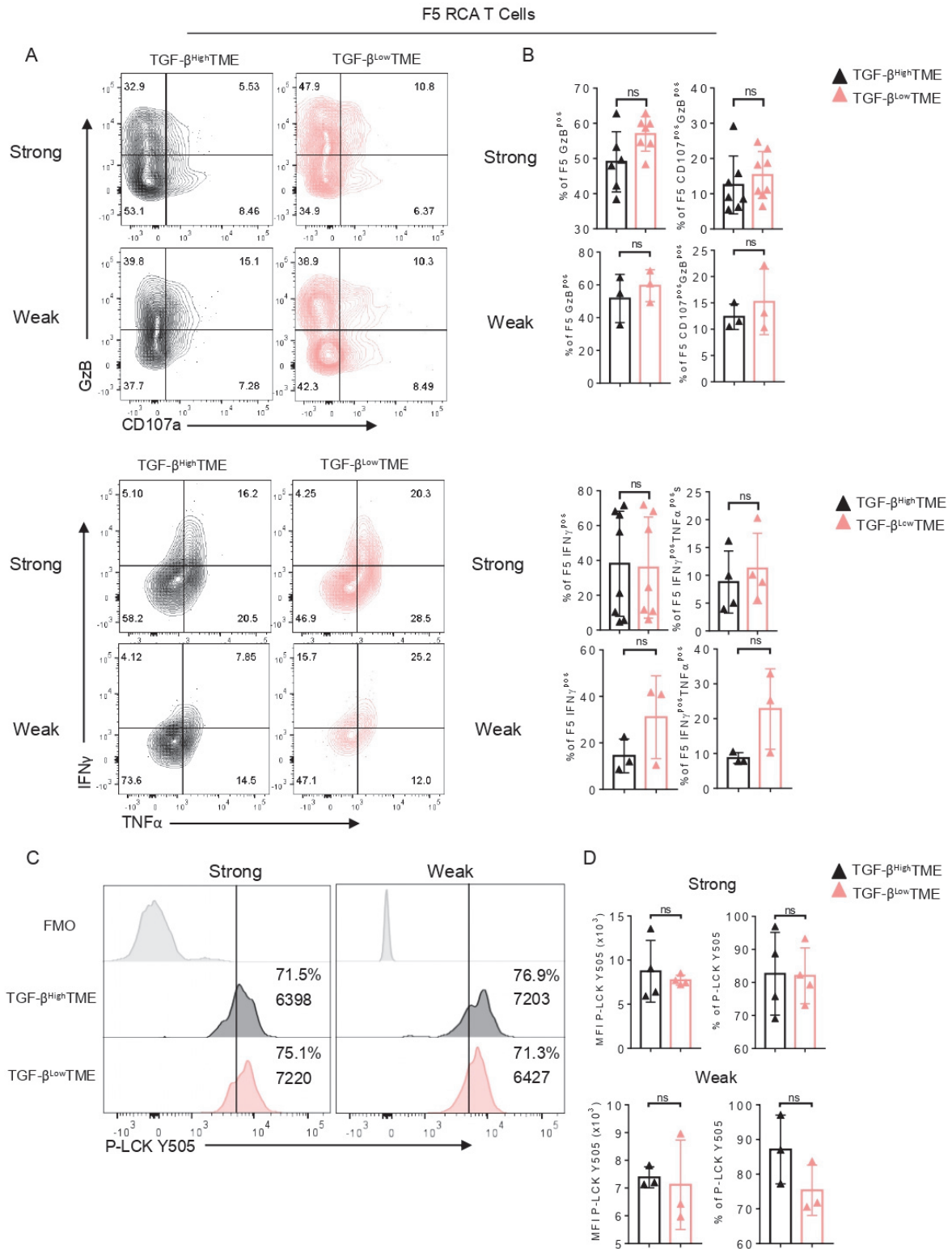
B

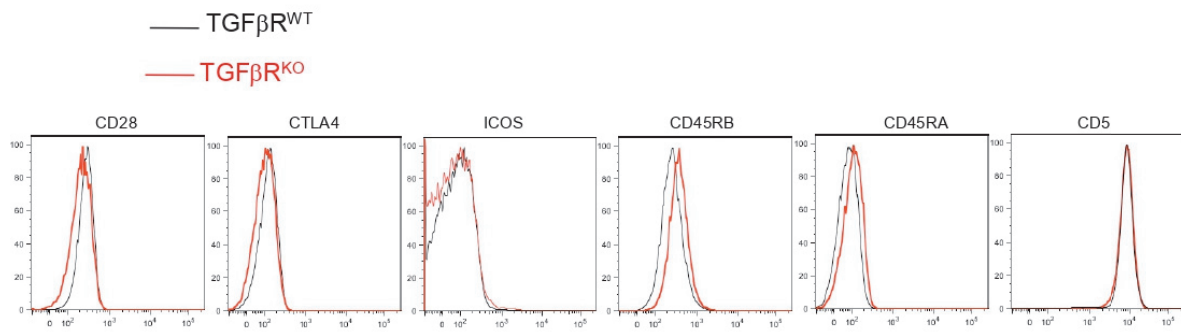
50:50 (Strong/Weak)

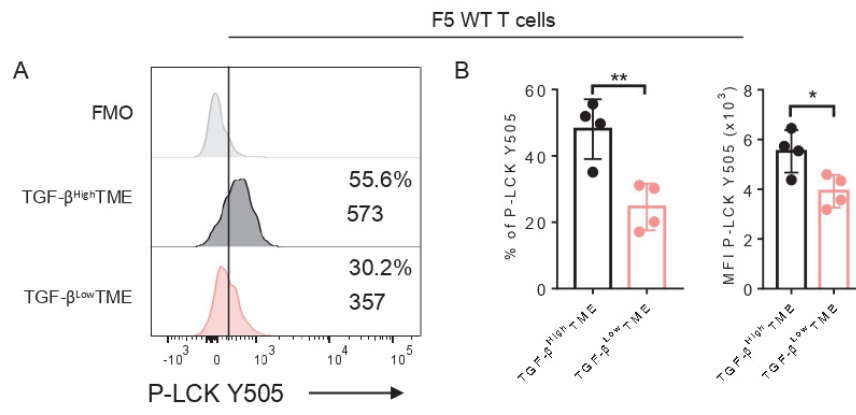


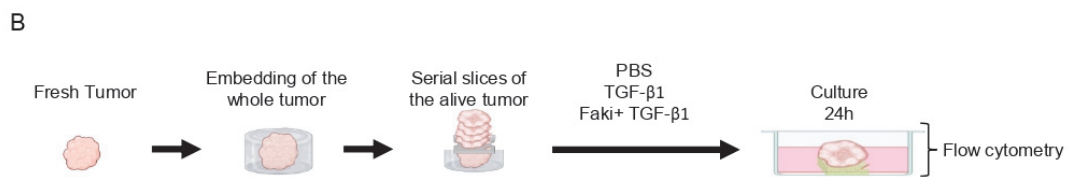
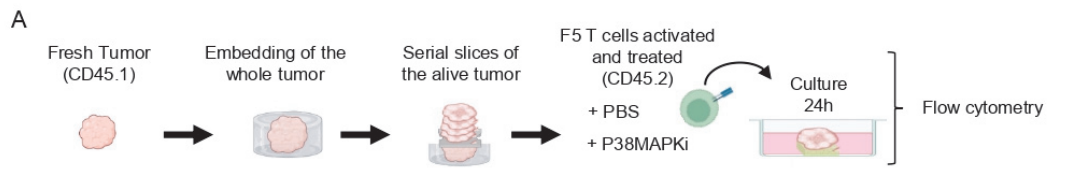
C











CONCLUSIONS

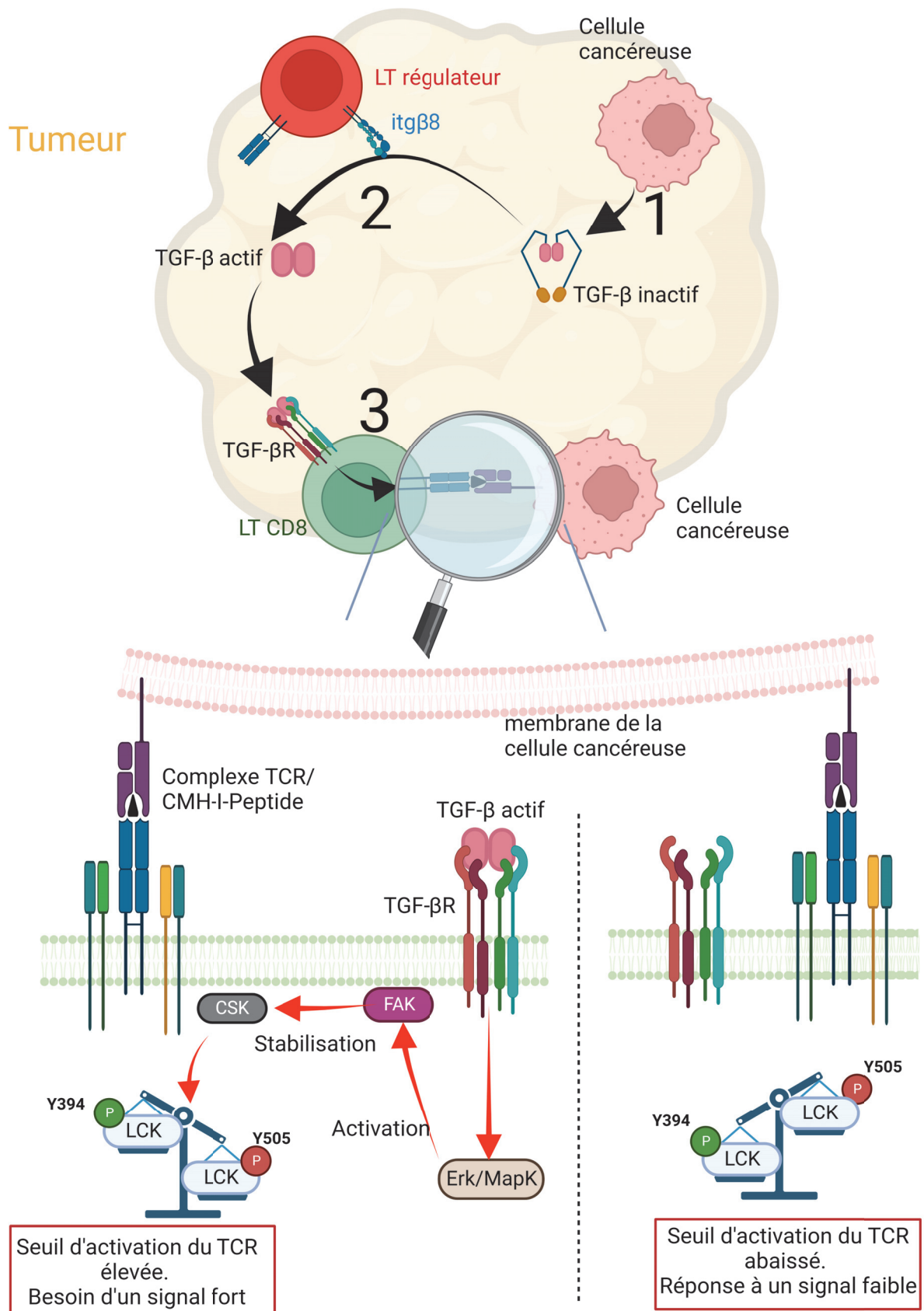


Figure 18 : Schéma de conclusion.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La réponse immunitaire adaptative est un penchant de l'immunité très étudié au niveau de la réponse anti-tumorale. Lors de cette réponse, divers mécanismes sont mis en jeu par la tumeur afin d'échapper au système immunitaire notamment par la présence de LTrégs mais encore par la production d'une cytokine hautement suppressive qui est le TGF- β .

Au cours de ma thèse, nous avons démontré que les cellules cancéreuses sont la source majeure de production du TGF- β au sein du micro-environnement tumoral. Cependant, cette cytokine est produite sous forme inactive et nos travaux nous ont permis de démontrer qu'une population de LTrégs exprimant l'itg β 8 est responsable de l'activation de ce TGF- β . De plus, nos travaux ont également montré que ce TGF- β actif diminue l'efficacité de la réponse anti-tumorale en rendant la réponse des LTs CD8 moins efficace. En effet, nous avons montré que la signalisation du TGF- β favorise la forme inactive de LCK (phosphorylée en position de la tyrosine Y505), qui est une protéine proximale dans la réponse du TCR, ce qui permet l'échappement des clones les moins affins pour les LTs CD8.

1) Les LTs régulateurs itg β 8^{POS}

(i) Origine des LTrégs itg β 8^{POS}

L'une des premières questions que soulèvent nos résultats est l'origine des LTrégs exprimant l'itg β 8. Au sein du labo, nous montrons que les LTrégs porteurs de l'itg β 8 ont une source périphérique (données non montrées et non publiées). Ces résultats sont confirmés par des études menées par les groupes de Haribhai et Schmitt (Haribhai et al. 2011; E. G. Schmitt et al. 2012). Il est retrouvé des LTrégs exprimant l'itg β 8 au niveau du thymus, cependant ces LTrégs ont une signature de cellules circulantes. Au niveau de cette population, une faible expression de RAG est retrouvée laissant penser que ces LTrégs ont déjà leurs TCR établis depuis longtemps. Toutefois la génération de ces LTrégs au niveau du thymus n'est pas à exclure. En effet, les LTrégs sont une population qui se développe très tôt chez la souris, à l'âge de 2,5 jours post naissance (Asano et al. 1996; Fontenot, Dooley, et al. 2005). Il serait intéressant d'utiliser notre modèle reporteur pour l'itg β 8, Itg β 8-td-tomato, pour analyser l'expression de l'itg β 8 au niveau du thymus de ces souriceaux afin de valider que les LTrégs itg β 8^{POS} ont bien une origine périphérique ce qui corroborerait les observations faites par le groupe de Worthington où ils montrent que l'itg β 8 est principalement exprimée sur des LTrégs activés en périphérie chez l'Homme mais également la souris (Worthington et al. 2015a).

Nous avons montré qu'au sein de la tumeur la population exprimant majoritairement l'itgβ8 est les LTrégs.

Cependant, comment est recrutée cette population au sein de la tumeur ?

Par une analyse transcriptomique, à l'état basal, nous avons montré que les LTrégs itgβ8^{pos} surexpriment des molécules impliquées dans la migration telles que CCR4, CCR6, CCR8 et CXCR3 par rapport aux LTrégs itgβ8^{neg}. Cela concorde parfaitement avec des observations qui ont pu être faites notamment par Koch (Koch et al. 2009; Redjimi et al. 2012) qui montrent que l'expression de CXCR3 par les LTrégs entraîne leur relocalisation au sein de la tumeur et permet l'inhibition des cellules immunitaires.

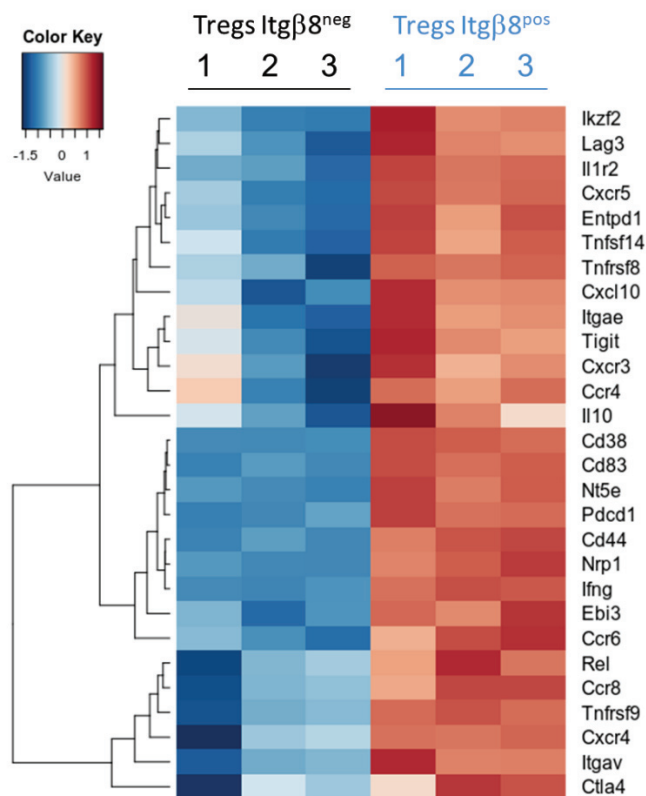


Figure 19 : Analyse heat-map montrant l'expression différentielle de certains gènes entre des LTrégs itgβ8^{pos} et LTrégs itgβ8^{neg}. La couleur rouge représente un haut niveau d'expression et la couleur bleu un faible niveau d'expression.

Quels sont les facteurs permettant l'induction des LTrégs itgβ8^{pos} ?

Nous avons pu remarquer que la population LTrégs $itg\beta 8^{pos}$ correspond à des LTrégs activés basée notamment sur les gènes qui peuvent être surexprimés tels que *Ctla4*, les différents *Tnfrs*, *cd44* et également *Pdcd1* (gène codant pour PD-1). Définir quels sont les mécanismes à l'origine de l'expression de l' $itg\beta 8$ est crucial afin de songer à un ciblage thérapeutique.

Les résultats de travaux de différentes équipes montrent au niveau de cellule dendritique que l'expression de l' $itg\beta 8$ est possible par le facteur de transcription Irf8 et de TGF- β (X. Ouyang et al. 2011; Yoshida et al. 2014; Boucard-Jourdin et al. 2016). Cependant, nous avons, par l'intermédiaire de l'analyse de l' $itg\beta 8$ par qRT-PCR au niveau de LTrégs déficients pour le récepteur au TGF- β RII corrélée à des expériences *in vitro*, montré que l'expression de l' $itg\beta 8$ peut être indépendante de IRF8 et du TGF- β . L'induction de l' $itg\beta 8$ pourrait alors se faire via un signal qui peut être donné au sein du T rég, ce signal étant celui du TCR. Pour cela, nous pourrions générer une lignée murine sous fond RAG^{KO} exprimant le TCR OT2 (TCR spécifique de l'ovalbumine restreint au CMH-II) et la croiser avec les souris *Itg β 8-td-tomato* : OT2 RAG^{KO} *itg β 8-Td-tomato*. Ainsi, l'ensemble des LTs développés par cette souris seraient des LTs CD4 et leur activation serait sous le contrôle de l'injection du peptide (Ova₃₂₃₋₃₃₉). Ce nouveau système d'étude permettrait de valider que l'activation du Treg, suite à l'engagement de son TCR, entraîne l'expression de l' $itg\beta 8$. Enfin, la régulation de l'expression de l' $itg\beta 8$ pourrait être induite par Foxo1. Il a pu être montré au sein de notre laboratoire par l'analyse de données provenant de la littérature (W. Ouyang et al. 2012) que Foxo1 peut se fixer sur le promoteur de l' $itg\beta 8$. Pour valider cette hypothèse, nous pouvons utiliser un modèle murin inductible déficient pour foxo1, car la délétion de foxo1 dans les LTrégs réduit considérablement leur développement et leur fonctionnalité *in vivo* (Kerdiles et al. 2010) avec nos souris reproductrices pour l' $itg\beta 8$ *Foxp3Cre-ert2 Foxo1^{fl-fl} X itg β 8-Td-tomato* afin d'observer si l'injection de tamoxifène entraîne une diminution de l'expression de l' $itg\beta 8$. De plus, il peut être envisagé pour l'expression de l' $itg\beta 8$ une combinaison entre l'activation du Treg et la présence de foxo1. Pour vérifier ceci, nous pourrions croiser les souris OT2 RAG^{KO} avec les souris *Foxp3Cre-ert2 foxo1^{fl-fl} itg β 8-Td-tomato* afin d'activer les LTrégs suite à l'injection de peptide Ova avec ou sans la délétion de foxo1 induite par l'injection de tamoxifène.

(ii) Effets de l'itgβ8 au niveau de la réponse immunitaire

De manière intéressante, nous avons montré que les LTrégs itgβ8^{POS} permettent d'assurer la répression cytotoxique des LTs CD8 par l'augmentation du TGF-β actif au sein du micro-environnement. Cependant, la répression est restreinte à la tumeur car la délétion de l'itgβ8 des LTrégs ne change pas la signalisation du TGF-β dans les LTs effecteurs au niveau du ganglion drainant la tumeur. Cela signifie que le TGF-β est activé par d'autres cellules exprimant l'itgβ8 ou par un autre mécanisme. Comme il a pu être montré, selon les tissus, l'itgβ8 peut être exprimée par différentes cellules notamment au niveau de l'intestin par les cellules dendritiques ou au niveau de la peau où cela semble être restreint aux kératinocytes (Travis et al. 2007; Cells et al. 2019; Worthington et al. 2011). Ainsi, il pourrait être envisagé qu'au niveau du ganglion la population majoritaire activant le TGF-β soit les cellules dendritiques. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions utiliser des souris CD11cCre Itgβ8^{fl/fl} afin de déléter spécifiquement l'intégrine au niveau des cellules dendritiques. S'en suit une injection de cellules cancéreuses et une analyse des ganglions drainants la tumeur à 5 jours et à 17 jours après l'inoculation des cellules cancéreuses.

2) Les effets du TGF-β sur la signalisation du TCR

Pour mettre en place une réponse anti-tumorale efficace, le TCR doit reconnaître un antigène apparenté présenté par des cellules cancéreuses. L'activation réussie des LTs entraîne une cascade de signalisation intracellulaire amenant à la libération des cytokines pro-inflammatoires et la libération des contenus cytotoxiques aboutissant à la mort de la cellule cancéreuse.

(i) LCK maestro de l'activation des TCRs

La signalisation du TGF-β est connue pour affecter directement le programme cytotoxique des LTs CD8 par la répression du granzyme B et de l'interféron-γ (Thomas et Massagué 2005a). Cependant, nous avons démontré au sein du laboratoire un nouvel aspect par lequel le TGF-β actif inhibe la réponse anti-tumorale, notamment par l'inhibition de la protéine LCK, kinase

proximale de la signalisation du TCR permettant l'activation du LT CD8. Comme décrit lors de l'introduction, cette protéine a un rôle central dans l'activation des LTs, notamment par la phosphorylation des domaines ITAMs du complexe TCR. Ainsi, les LTs régulateurs exprimant l'itgβ8 entraînent une augmentation du TGF-β bioactif ce qui induit une phosphorylation plus importante de sa conformation inactive. En effet, nous avons montré que l'absence de TGF-β bioactif dans le micro-environnement tumoral permet une réponse efficace contre l'antigène exprimé par la tumeur (que ce soit un antigène de faible ou de forte affinité) due à LCK qui n'est plus maintenu dans sa conformation inactive. Ainsi, le ratio de LCKactif/LCKinactif est en faveur de l'activation suite à des signaux de faible ou forte affinité. Ces résultats obtenus font écho aux différentes publications qui sont retrouvées dans la littérature. En effet, l'absence de la signalisation de LCK, par sa délétion par exemple, entraîne chez des souris une atrophie du thymus et un blocage des thymocytes lors de leur développement durant la transition de DN à DP. Cependant, une faible proportion de SP CD4 ou CD8 se retrouve à la périphérie et est incapable de mettre en place une réponse antivirale efficace, démontrant l'importance de LCK dans la propagation du signal reçu par le TCR (T. J. Molina et al. 1992; Thierry J Molina et al. 1993). De plus, il a pu être montré que la signalisation du TCR interfère avec celle du TGF-β via la voie de la PKC-θ induisant une expression de SMAD7 pour réprimer la signalisation du TGF-β (Giroux et al. 2010). Une publication récente montre que la protéine LCK liée au co-récepteur CD8 après son activation permet l'amélioration de la réponse face aux antigènes de faible affinité (Horkova et al. 2022). Enfin, de nombreuses études portant sur la conformation de LCK ou sa localisation au sein de la cellule ont montré qu'en présence d'un LCK muté (bloqué dans sa conformation inactive ou bloqué dans sa conformation prime sans la phosphorylation en Y394) aucune entrée de calcium n'est induite suite à la stimulation du TCR (Philipsen et al. 2017). Ainsi, le signal donné par le TGF-β au système immunitaire impacte grandement le niveau d'activation du LT autant pour les LTs CD4 que les LT CD8 comme il a pu être montré par Shu et al. avec des souris déficientes en production de TGF-β1 qui meurent 3 à 4 semaines après leur naissance (Shull et al. 1992). Il y a quelques années, Koltarz et al ont montré chez 3 jeunes patients (de quelques mois à 11 ans) que la déficience de production de TGF-β1 entraîne des maladies inflammatoires de l'intestin ainsi que des encéphalopathies, toutes deux dues à un mauvais contrôle de la réponse immunitaire par les LT régulateurs. Ceux-ci sont grandement diminués par l'absence de TGF-β1 qui joue un rôle dans leur stabilité et par la

sortie de clones auto-réactifs non éliminés au niveau du thymus induits par la déficience en TGF- β 1 (Kotlarz et al. 2018; Mccarron et al. 2019).

Nous avons pu voir au niveau des LTs F5, dont le récepteur au TGF- β est délété, que les TCRs ont tendance à se grouper et un co-marquage entre LCK active (Y394) et le TCR est alors visible. En effet, nous avons confirmé que l'absence du récepteur au TGF- β induit un changement dans la balance LCK actif/inactif en la faveur de la forme active. De plus, il a pu être montré par Rossy, qu'en présence d'une forme mutée de LCK qui permet de maintenir LCK dans sa conformation active, le clustering (regroupement des TCRs) était nettement amélioré par rapport au contrôle (Rossy et al. 2013). Cela permet donc un signal amélioré au niveau proximal du TCR.

(ii) Régulation du maestro

Nous avons pu montrer que la signalisation du TGF- β induit une augmentation de CSK, qui est une protéine connue pour réguler négativement LCK. Ainsi, nous montrons qu'au sein du micro-environnement le TGF- β activé par les LTrégs itg β 8^{pos} induit une augmentation de l'activité de CSK entraînant une diminution de la réponse anti-tumorale efficace. En effet, il a pu être montré *in vitro* dans des LTs CD8 ou CD4 provenant de souris avec une forme mutante (inhibitrice) de CSK, une amélioration de la réponse immunitaire de manière globale mais également contre des antigènes de faible affinité (Manz et al. 2015). Il a pu être montré, dans le cas du cancer de la prostate, que la diminution de l'activité de CSK induite par ACK1 entraînait une meilleure réponse contre les cellules cancéreuses (Sridaran et al. 2022). Cela valide donc l'effet inhibiteur de CSK sur la signalisation du TCR.

A l'état basal, il est retrouvé un pool de LCK actif bien que CSK agisse pour engendrer le passage de la forme active en forme inactive de LCK. Ainsi, on pourrait penser que, dans le cas d'une rencontre entre le TCR et le complexe CMH-I/antigène de forte affinité, le pool de LCK actifs présents au sein de la cellule entraîne un début de signalisation permettant les phosphorylations précoces et ce pool est amplifié du fait de l'activation du LT. Cependant, dans le cas de la rencontre d'un complexe CMH-I/peptide de faible affinité, le pool de LCK actif n'est pas suffisant pour induire le signal nécessaire à l'activation et CSK applique un maintien

en conformation inactive du reste du pool de LCK ce qui n'induit pas de signalisation et, de ce fait, une absence de réponse des LTs.

Dans ce contexte, il serait intéressant de générer des animaux CD4Cre-ert2 CSK^{fl/fl} F5 RAG^{KO} couplés avec un LCK associé à un système FRET (cLCK-Y2) (Philipsen et al. 2017) (CSK^{KO}) afin de déléter CSK suite à l'ajout de tamoxifène pour observer la dynamique de LCK grâce au système FRET. Ainsi, ces souris nous permettront de répondre à une double question l'effet de CSK sur la dynamique de LCK lors de la réponse aux antigènes de faible et forte affinité. De plus, l'injection de souris WT avec les LTs de la souris CSK^{KO} et des tumeurs NP3R ou NP68 permettrait de valider cette hypothèse suite à l'analyse des LTs issus des tumeurs ayant reçu ou non du tamoxifène. Enfin, cela permettrait de déterminer si le contrôle du TCR est exclusif à CSK ou s'il y a une redondance dans cette action, du fait de nombreux adaptateurs que CSK possède pour induire le maintien de LCK dans sa conformation inactive.

3) Impact du du TGF- β sur les LTs à l'état naïf

Le TGF- β peut également avoir un impact sur les LTs. En effet il a pu être montré dans de nombreuses études que l'absence de la cytokine ou du récepteur sur les LTs entraîne le développement de maladies auto-immunes sévères et la mort des animaux 3 à 4 semaines après leur naissance (Shull et al. 1992; Marie, Liggitt, et Rudensky 2006a). C'est pourquoi nous avons utilisé au laboratoire des modèles murins fond RAG^{KO} avec le récepteur au TGF- β délété au niveau de LTs spécifiques d'un antigène (souris F5 TGF- β RII^{KO}).

Dans une étude publiée par Igalouzene et al (Igalouzene et al. 2022), les auteurs ont remarqué qu'à l'état naïf les LTs F5 TGF- β RII^{KO} possèdent un transcriptome bien différent de leur contrôle. En effet, ils remarquent que les LTs dont le récepteur au TGF- β est éliminé expriment plus de *Gzmb* (granzyme B), *Eomes*, *Ifng* (interféron- γ), mais également des molécules impliquées dans l'adhésion telles que *itgax*, *itga1* laissant penser que ces cellules adoptent un phénotype mémoire (Cheuk et al. 2017; Igalouzene et al. 2022). Cela laisse sous-entendre que l'absence de la signalisation du TGF- β entraînerait la mise en place des programmes nécessaires aux LTs CD8 pour une réponse efficace.

J'ai également pu ré-analyser des données de RNAseq de LTs F5 TGF- β RII^{KO} et LT F5 TGF- β RII^{WT} à l'état basal, générées au sein du laboratoire (Igalouzene et al. 2022). J'ai en effet pu voir que différents gènes impliqués dans le métabolisme étaient surexprimés lorsque les LTs n'ont plus

le récepteur au TGF- β . Parmi ces gènes, *glut3*, codant pour GLUT3 qui est un transporteur de glucose retrouvé au niveau de la membrane plasmique des cellules, est principalement exprimé et *hk3* (hexokinase 3) qui codent pour la protéine du même nom. Les hexokinases sont notamment connues pour phosphoryler le glucose en glucose-6-phosphate, qui est un point d'entrée dans la plupart des voies du métabolisme du glucose.

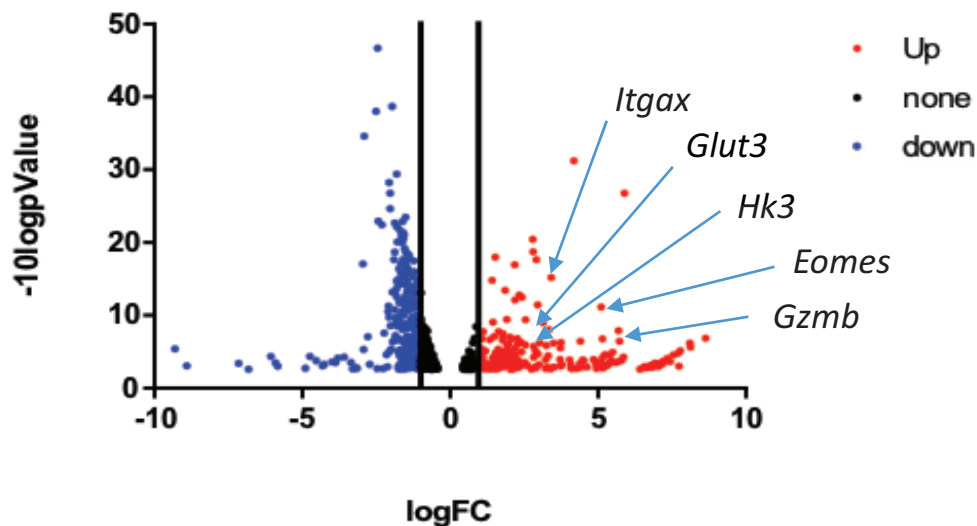


Figure 20 : Volcano plot des données RNA-seq provenant de LTs F5 TGF- β R11^{KO} vs LT F5 TGF- β R11^{WT} naïfs. Les gènes sélectionnés comme significativement différents sont mis en évidence par des points rouges pour les sur-exprimés et en bleu pour les sous-exprimés.

En extrapolant, ces données corroborent avec nos résultats. En effet, le TGF- β semble induire une diminution de l'activité métabolique or, cette dernière est centrale dans l'activation des LTs et dans la mise en place de la réponse effectrice comme il a pu être montré par Toriyama. En effet, il montre qu'en absence de la glycolyse, les LTs activés prolifèrent beaucoup moins ou ne prolifèrent pas et leur production d'IFN γ est nettement diminuée rendant ainsi une réponse efficace impossible (Toriyama et al. 2020). Ces résultats de la littérature sont également confirmés par une étude mettant en lumière l'effet du TGF- β sur le transcriptome induit par Myc suite à la stimulation du TCR. En effet, il a pu être montré par analyse RNAseq mais aussi par des expériences *in vitro* que la stimulation de LTs OT1 avec le peptide OVA et du TGF- β entraînait une baisse d'expression des molécules impliquées dans le métabolisme notamment les hexokinase mais également les transporteurs de glucose (Hope et al. 2022).

4) Quelques limites

Grâce au modèle utilisé, nous avons montré que le TGF- β activé par les LTrégs itg β 8^{POS} impacte grandement la mise en place d'une réponse anti-tumorale efficace contre les cellules cancéreuses. Cependant, quelques limites peuvent être soulevées dans l'utilisation de ce genre de modèle. En effet, les antigènes NP68 et NP3R spécifiques des LTs F5 (avec pour l'un une forte affinité et l'autre une faible affinité) sont des antigènes très immunogènes issus de la nucléoprotéine d'influenza (virus de la grippe). De plus, dans les modèles tumoraux utilisés généralement en cancérologie, les tumeurs sont souvent générées par l'injection de cellules cancéreuses ce qui n'est pas physiologique. Ainsi, cette différence a pu être appréciée par Guerin qui observent que les infiltrats immunitaires sont différents entre la même tumeur mais induite différemment soit par l'injection soit par le développement spontané (Guerin et al. 2019).

De surcroît, lors de notre étude, les cellules cancéreuses de haute et faible affinités expriment toutes le peptide ce qui induit un biais dans la réponse immunitaire. En effet, le processus tumoral est un processus long à se mettre en place et fait intervenir l'immuno-édition. Lors de ce processus et avant la mise en place de la tumeur à proprement parler, les clones induisant une réponse immunitaire sont éliminés ce qui engendre des cellules cancéreuses qui sont invisibles pour le système immunitaire. Afin d'améliorer notre étude, il serait intéressant de conduire cela sur des modèles tumoraux spontanés dans des souris CD8^{cre-ert2} TGF- β RII^{fl/fl} pour déléter la signalisation du TGF- β dans les CD8 au cours du processus tumoral.

Nous nous attendons à des résultats similaires car il a pu être montré chez des souris déficientes pour la production en TGF- β 1, une auto-immunité multi-organes sévère et la mort des souris 3 à 4 semaines après leur naissance. Ce phénotype est le même lorsque le TGF- β RII est délété dans tous les LTs ce qui implique que la levée de l'inhibition induite par le TGF- β permet la réponse aux auto-antigènes (Shull et al. 1992; Marie, Liggitt, et Rudensky 2006a).

5) Application en clinique/ Perspectives cliniques

(i) Le cas de la protéine FAK

Nous avons pu montrer que l'activation du TGF- β dans le micro-environnement et sa signalisation induisent une augmentation de l'activité de FAK caractérisée par sa phosphorylation. En effet, FAK est une cible dans les tumeurs du fait de son expression au sein des cellules cancéreuses et de son activité au niveau de ces dernières. En effet, il a pu être montré qu'une ablation de FAK au niveau des cellules cancéreuses entraîne une diminution de la croissance tumorale ainsi qu'une réponse anti-tumorale plus efficace (Ozmadencia et al. 2022; Canel et al. 2020). Il a pu également être montré que l'inhibition de FAK par miRNA, dans des CD4 humains périphériques isolés du sang, induit une diminution de CSK à la membrane et une activation de ZAP70 (traduite par sa phosphorylation) plus importante suite à l'activation via un anti-TCR (Chapman et al. 2014). Cela confirme ce que nous avons pu observer au niveau de nos LTs F5 (Figure 3 du deuxième papier). De plus, le traitement de coupe de tumeurs avec un inhibiteur de FAK améliore la réponse des LTs CD8 (datas non montrées). Cependant, lorsque les LTs sont prétraités avec l'inhibiteur de FAK, aucune différence n'est notable en terme de production de granzyme B pour les tumeurs de faible ou forte affinité mais, la présence de l'inhibiteur de FAK entraîne la diminution de la forme inactive de LCK. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'en traitant la tranche tumorale avec l'inhibiteur de FAK, une réponse au niveau du LT mais également de la tumeur s'effectue ce qui induit une production de molécules cytotoxiques. Mais, dans le cas d'un pré-traitement des LTs avec l'inhibiteur de FAK, nous remarquons que la production cytotoxique des LTs ne varie pas. Ainsi, deux hypothèses s'offrent à nous pour expliquer ce résultat : (1) les résultats générés par l'inhibiteur de FAK sont la résultante d'une inhibition au niveau des cellules cancéreuses mais également au niveau des LTs, (2) les LTs ont besoin de l'inhibition de FAK au cours de la réponse anti-tumorale. Afin de valider cela, il serait intéressant d'utiliser des souris CD8Cre-ERT2 (ou CD4Cre-ERT2) FAK^{fl/fl} afin de déléter FAK suite à l'ajout de tamoxifène (ou via l'ajout de Tat-Cre) au cours de la réponse contre la cellule cancéreuse.

L'intérêt pour les fonctions pro-tumorales du TGF- β et de sa présence dans un grand nombre de cancers (the human protein atlas : <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105329->

[TGFB1/pathology](#)) a conduit au développement d'antagonistes intervenant à plusieurs niveaux dans la signalisation du TGF- β .

(ii) Blocage de la voie de signalisation du TGF- β

a- Ciblage de la forme inactive du TGF- β

SRK-181 est un anticorps bloquant se liant sélectivement sur le TGF- β 1 latent et ainsi empêche son activation (C. J. Martin et al. 2020). Cet anticorps permet également une combinaison avec l'anti-PD1 qui potentialise grandement la réponse anti-tumorale médiée par les LTs CD8. De plus, une faible toxicité cardiovasculaire est rapportée suite à l'utilisation de cet inhibiteur comparée à son homologue.

La forme inactive du TGF- β peut également être fixée avec GARP. C'est dans ce contexte que le 58A2 est développé, il reconnaît GARP et le TGF- β inactif inhibant l'activation du TGF- β (Streel et al. 2020). De plus, cet inhibiteur induit la suppression des LTrégs exprimant GARP entraînant un défaut de la réponse anti-tumorale.

Enfin, au niveau extracellulaire, les inhibiteurs pouvant bloquer la signalisation ciblent les intégrines β 6 ou β 8. Tout comme nous l'avons démontré dans le premier papier de notre étude, l'utilisation de l'anticorps bloquant l'intégrine itg β 8 permet de restaurer une activité cytotoxique efficace contre les cellules cancéreuses (Dodagatta-Marri et al. 2021). Dans cette optique, nous avons un partenariat avec une entreprise privée américaine qui met en place sur le marché un inhibiteur de l'action des intégrines. Dans ce cadre, j'ai pu apprécier l'efficacité de la réponse immunitaire après le traitement par leur inhibiteur (données non montrées car confidentielles).

Il a pu également être mis en place le traitement via des petites molécules pour freiner l'activation du TGF- β R, notamment en ciblant l'activité kinase du TGF- β RI. C'est notamment le cas du Galunisertinib (LY2157299) qui permet une amélioration de la réponse anti-tumorale en association avec le sorafenib (inhibiteur des tyrosine kinases) (Ikeda et al. 2019).

b- Blocage de la signalisation du TGF- β par la capture

D'autres thérapies ont été envisagées se basant sur des anticorps ciblant d'une part le TGF- β et d'autre part des molécules induisant l'immuno-évasion telles que PD-L1 ou encore CTLA-4. C'est notamment le cas pour le M7824, bintrafusp alfa, qui permet de meilleures réponses dans les modèles murins injectés avec des cellules cancéreuses (Lan et al. 2018).

(ii) Blocage de l'effet du TGF- β au niveau cellulaire

Une des technologies très en vogue ces dernières années est l'utilisation des cellules T CAR pour améliorer la réponse anti-tumorale contre les antigènes de faible affinité. Cette technique repose sur l'expression d'un récepteur chimérique qui, lors de la reconnaissance de son antigène, induit l'activation du LT. Dans ce cadre, des tests ont conduit à la génération de cellules T CAR dirigées contre le virus d'Epstein-Barr dans le lymphome Hodgkinien exprimant le TGF- β R-DN, permettant une réponse importante chez les patients traités (Bollard et al. 2018).

Une des approches très intéressantes également et qui est développée par le groupe de Yvonne Chen est de diriger le CAR contre un récepteur fortement exprimé mais également contre le TGF- β 1 actif, cela permet d'utiliser la cytokine inhibitrice activée en faveur de la réponse anti-tumorale (données présentées lors du CICON 2022). Ainsi, après injection d'un glioblastome exprimant fortement IL13R α , le groupe a généré des cellules T CAR bi-spécifiques reconnaissant l'IL13R α et le TGF- β actif. Les cellules T CAR ont été injectées directement au niveau de la tumeur et le groupe a pu apprécier une nette diminution de la croissance tumorale associée à une réponse cytotoxique élevée sans pour autant voir le développement d'auto-immunité ce qui doit être dû à la méthode d'injection des cellules T CAR (données présentées lors du CICON 2022).

Une autre approche qui serait intéressante de développer serait de réaliser un LT génétiquement modifié ou sur la base d'un CAR afin d'induire une délétion de certaines protéines via CRISPR/CAS9. Ainsi, dans notre cas et si cette technique voit le jour, nous pourrions imaginer d'éliminer spécifiquement CSK ou FAK suite à la reconnaissance du CAR et ainsi induire une meilleure réponse des LTs. Ce genre de technique permettrait de cibler spécifiquement les LTs modifiés en diminuant au maximum les « off targets » et diminuer le nombre de cas indésirables.

(iii) Essais cliniques

Molécules ou nom de l'essai	Cible/effet de la molécule	Début	Année de dernière mise à jour	Boîte et/ou Référent scientifique	Phase	Numéro de l'étude	Type de cancer	Nombre de participant	Information (protocole)	Résultats
AP 12009 (OT101 = Trabedersen)	oligodéoxynucléotide antisens phosphorothioate spécifique de l'ARNm du facteur de croissance transformant bêta2 humain	2007	2013	Isarna Therapeutics GmbH Ulrich Bogdahn, MD University of Regensburg, Dept. of Neurology, Germany	IIb	NCT00431561	Glioblastome (GBM) astrocytome anaplasique (AA)	141	AP 12009 (10µM) AP 12009(80µM) Temozolomide/procarbazine, lomustine et vincristine	Amélioration de la survie globale Amélioration de la survie sans progression de la maladie
AP 12009 (OT101 = Trabedersen)	oligodéoxynucléotide antisens phosphorothioate spécifique de l'ARNm du facteur de croissance transformant bêta2 humain	2008	2014	Isarna Therapeutics GmbH Hubert Heinrichs, MD, PhD, Chief Medical Officer, Antisense Pharma	III	NCT00761280	Glioblastome Secondaire Réfractaire ou récurrent astrocytome anaplasique (AA)	27	AP 12009 (10µM) Temozolomide ou Carmustine ou lomustine	Non disponible
AP 12009 (OT101 = Trabedersen)	oligodéoxynucléotide antisens phosphorothioate spécifique de l'ARNm du facteur de croissance transformant bêta2 humain	2005	2019	Isarna Therapeutics GmbH Helmut Oettle, MD Charité Berlin Campus Virchow-Klinikum	I	NCT00844064	Tumeurs du pancréas Mélanome Tumeurs colorectales	62	AP 12009 (avec dose croissante)	Non disponible

Tableau 1 : Thérapies en essais clinique contre le TGF-β dans le cancer basé sur les oligonucléotides antisens (Uckun et al. 2019).

Molécules ou nom de l'essai	Cible/ effet de la molécule	Début	Année de dernière mise à jour	Boite et/ou Référent scientifique	Phase	Numéro de l'étude	Type de cancer	Nombre de participant	Information (protocole)	Résultats
EMD 12974 (intégrines $\alpha\text{v}\beta 3$ $\alpha\text{v}\beta 5$)	Substance interagissant avec les intégrines $\alpha\text{v}\beta 3$ $\alpha\text{v}\beta 5$	2009	2015	Michael Maitland University of Chicago Comprehensive Cancer Center	I	NCT01122888	Glioblastome à cellules géantes Glioblastome Gliosarcome	41	Sunitib + EMD 121974 Sunitib	Non disponible
Cilengitide = EMD 12974 (intégrines $\alpha\text{v}\beta 3$ $\alpha\text{v}\beta 5$)	Substance interagissant avec les intégrines $\alpha\text{v}\beta 3$ $\alpha\text{v}\beta 5$	2008	2014	Merck KGaA, Darmstadt, Germany Jan Vermorken, MD, PhD University Hospital, Antwerp	I/II	NCT00705016	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	184	Cilengitide (2g une fois par semaine) + Cetuximab + 5-FU + Cisplatine Cilengitide (2g deux fois par semaine) + Cetuximab + 5-FU + Cisplatine	Pas de différence entre la présence ou non du Cilengitide
IMGN388	IgG1 anti-intégrines αv	2008	2013	ImmunoGen, Inc.	I/II	NCT00721669	Mélanome Carcinome du sein Carcinome pulmonaire Carcinome ovarien	60	IMGN388	Non disponible

Tableau 2 : Thérapies en essais clinique contre le TGF- β dans le cancer basé sur les inhibiteurs d'intégrines (Vermorken et al. 2014).

Molécules ou nom de l'essai	Cible/effet de la molécule	Début	Année de dernière mise à jour	Boîte et/ou Référent scientifique	Phase	Numéro de l'étude	Type de cancer	Nombre de participant	Information (protocole)	Résultats
GC1008	Anticorps bloquant l'activité du TGF-β1 et TGF-β2	2006	2019	Jay A Berzofsky, M.D National Cancer Institute (NCI)	Ib	NCT00923169	Melanome Carcinome renal	22	GC1008 (10mg/kg) GC1008 (15mg/kg)	résultat de la première partie de l'étude. Le meilleur dose de réponse 15mg/kg. 3 patients sur 22 atteint de mélanome de l'étude la ont développé des problèmes de peau (pas de corrélation établi)
GC1008	Anticorps bloquant l'activité du TGF-β1 et TGF-β2	2011	2019	Silvia Formenti, M.D. NVU Langone Health	II	NCT01401062	Cancer du sein métastatique	23	GC1008 (1mg/kg)+ radiothérapie GC1008 (10mg/kg)+ radiothérapie	pas de changement dans l'effet abscopal (dû à la régression des métastases à distances du site traité par radiothérapie) La dose à 10mg/kg + la radiothérapie améliore la survie globale des patients
LY3022859 (=IMC-TR1)	anticorps monoclonal dirigé contre TGF-βRII (empêchant la fixation du TGF-β)	2012	2019	Eli Lilly and Company	I	NCT01646203	Tumeurs solide avancée	14	LY3022859 (1,25mg/kg) LY3022859 (12,5mg à 1600mg) LY3022859 (8000mg à 16000mg)	La dose escalade au-delà de 25mg a été considéré comme dangereuse en raison de libération de cytokines incontrôlée (notamment)
AVID200	Inhibiteur de TGF-β1 et TGF-β3	2019	2020	Paul I Nadler, MD Forbius (Formation Biologics)	I	NCT03834662	Tumeurs solide maligne	36	AVID200 (180mg/m ²) AVID200 (550mg/m ²) AVID200 (1100mg/m ²)	non disponible
Y101D	Anticorps bispécifique dirigé contre PD-L1 et TGF-β	2021	2021	Li Zhang, MD Cancer Prevention Center, Sun Yat-sen University	I	NCT05028556	Tumeur solide métastatique ou avancé	126	Y101D (1mg/kg) Y101D (3mg/kg) Y101D (10mg/kg) Y101D (20mg/kg) Y101D (30mg/kg)	non disponible

Tableau 3 : Thérapies en essais clinique contre le TGF-β dans le cancer basé sur l'interaction entre le ligand et le récepteur (Tolcher et al. 2017).

Molécules ou nom de l'essai	Cible/effet de la molécule	Début	Année de dernière mise à jour	Boîte et/ou Référent scientifique	Phase	Numéro de l'étude	Type de cancer	Nombre de participant	Information (protocole)	Résultats
LY3200882	TGF- β R1	2019	2019	PR J Tabernero PR R Bernards, MD, PhD R Salazar, Pr S Siena Pr A Crvantes, Pr F Ciardello, Pr A Bardelli, Pr S Tejpar	I/II	NCT04031872	Cancer colorectal métastatique	31	LY3200882 + capecitabine	non disponible

Tableau 4 : Thérapies en essais clinique contre le TGF- β dans le cancer basé sur des inhibiteurs de kinase.

Molécules ou nom de l'essai	Cible/effet de la molécule	Début	Année de dernière mise à jour	Boîte et/ou Référent scientifique	Phase	Numéro de l'étude	Type de cancer	Nombre de participant	Information (protocole)	Résultats
TGF- β R-KO CAR-EGFR T Cells	Cellules CART dirigé contre le récepteur à l'EGF et dont la sous-unité II du récepteur au TGF- β est déletée par CRISPR/CAS9	2022	2022	Weidong Han, PhD Biotherapeutic Department, Chinese PLA General Hospital	I	NCT04976218	Tumeur solide (exprimant l'EGFR)	30	Injection de TGF- β R-KO CAR-EGFR T Cells avec des doses	non disponible

Tableau 5 : Thérapies en essais clinique dans le cancer par la délétion du récepteur au TGF- β dans des CAR-T.

REFERENCES

- Agata, Yasutoshi, Akemi Kawasaki, Hiroyuki Nishimura, Yasumasa Ishida, Takeshi Tsubata, Hideo Yagita, et Tasuku Honjo. 1996. « Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes ». *International Immunology* 8 (5): 765-72.
- Ahamed, Jasimuddin, Nathalie Burg, Keiji Yoshinaga, Christin A Janczak, Daniel B Rifkin, et Barry S Collier. 2008. « In vitro and in vivo evidence for shear-induced activation of latent transforming growth factor- β 1 ». *Blood* 112 (9): 3650-60. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-151753>.An.
- Andersen, Thorny Cesilie Bie, Per Eugen Kristiansen, Zsuzsa Huszenicza, Maria U. Johansson, Ramakrishna Prabhu Gopalakrishnan, Hanna Kjelstrup, Scott Boyken, et al. 2019. « The SH3 Domains of the Protein Kinases ITK and LCK Compete for Adjacent Sites on T Cell-Specific Adapter Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 294 (42): 15480-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008318>.
- Appleby, Mark W., Jane A. Gross, Michael P. Cooke, Steven D. Levin, Xuan Qian, et Roger M. Perlmutter. 1992. « Defective T Cell Receptor Signaling in Mice Lacking the Thymic Isoform of P59fyn ». *Cell* 70 (5): 751-63. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90309-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90309-Z).
- Arumugam, V., T. Bluemn, E. Wesley, A. M. Schmidt, T. Kambayashi, S. Malarkannan, et M. J. Riese. 2015. « TCR Signaling Intensity Controls CD8+ T Cell Responsiveness to TGF- β ». *Journal of Leukocyte Biology* 98 (5): 703-12. <https://doi.org/10.1189/jlb.2HIMA1214-578R>.
- Asano, Masanao, Masaaki Toda, Noriko Sakaguchi, et Shimon Sakaguchi. 1996. « Autoimmune Disease as a Consequence of Developmental Abnormality of a T Cell Subpopulation ». *The Journal of Experimental Medicine* 184 (August): 387-96.
- Asrir, Assia, Claire Tardiveau, Juliette Coudert, Robin Laffont, Lucas Blanchard, Elisabeth Bellard, Krystle Veerman, et al. 2022. « Tumor-Associated High Endothelial Venules Mediate Lymphocyte Entry into Tumors and Predict Response to PD-1 plus CTLA-4 Combination Immunotherapy ». *Cancer Cell* 40 (3): 318-334.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.01.002>.
- Attisano, Liliana, et Jeffrey L. Wrana. 2002. « Signal Transduction by the TGF- β Superfamily ». *Science* 296 (5573): 1646-47. <https://doi.org/10.1126/science.1071809>.
- Bachmann, M. F., A. Gallimore, S. Linkert, V. Cerundolo, A. Lanzavecchia, M. Kopf, et A. Viola. 1999. « Developmental Regulation of Lck Targeting to the CD8 Coreceptor Controls Signaling in Naive and Memory T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (10): 1521-30. <https://doi.org/10.1084/jem.189.10.1521>.
- Barber, Daniel L., E. John Wherry, David Masopust, Baogong Zhu, James P. Allison, Arlene H. Sharpe, Gordon J. Freeman, et Rafi Ahmed. 2006. « Restoring Function in Exhausted CD8 T Cells during Chronic Viral Infection ». *Nature* 439 (7077): 682-87. <https://doi.org/10.1038/nature04444>.
- Barcellos-Hoff, M. H., R. Derynck, M. L.-S. Tsang, et J. A. Weatherbee. 1994. « Transforming Growth Factor- β Activation in Irradiated Murine Mammary Gland ». *The Journal of Clinical Investigation* 93 (February): 892-99.
- Bartholin, Laurent, Farhan S. Cyprian, David Vincent, Céline N. Garcia, Sylvie Martel, Branka Horvat, Cyril Berthet, et al. 2008. « Generation of Mice with Conditionally Activated Transforming Growth Factor Beta Signaling through the TbetaRI/ALK5 Receptor ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 46 (12): 724-31. <https://doi.org/10.1002/dvg.20425>.

- Betelli, Estelle, Yijun Carrier, Wenda Gao, Thomas Korn, Terry B. Strom, Mohamed Oukka, Howard L. Weiner, et Vijay K. Kuchroo. 2006. « Reciprocal Developmental Pathways for the Generation of Pathogenic Effector TH17 and Regulatory T Cells ». *Nature* 441 (7090): 235-38. <https://doi.org/10.1038/nature04753>.
- Bhat, Purnima, Graham Leggatt, Nigel Waterhouse, et Ian H Frazer. 2017. « Interferon- γ Derived from Cytotoxic Lymphocytes Directly Enhances Their Motility and Cytotoxicity ». *Cell Death & Disease* 8 (6): e2836-e2836. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.67>.
- Bianchi, Marco E. 2007. « DAMPs , PAMPs and alarmins : all we need to know about danger Abstract : Multicellular animals detect pathogens ». *Journal of Leukocyte Biology* 81 (January): 1-5. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>.
- Blachère, Nathalie E, Robert B Darnell, et Matthew L Albert. 2005. « Apoptotic Cells Deliver Processed Antigen to Dendritic Cells for Cross-Presentation ». *Plos Biology* 3 (6): 1070-78. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030185>.
- Boehmer, Harald von. 2005. « Unique Features of the Pre-T-Cell Receptor α -Chain: Not Just a Surrogate ». *Nature Reviews Immunology* 5 (7): 571-77. <https://doi.org/10.1038/nri1636>.
- Boggon, Titus J., et Michael J. Eck. 2004. « Structure and Regulation of Src Family Kinases ». *Oncogene* 23 (48): 7918-27. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208081>.
- Bollard, Catherine M, Tamara Tripic, Conrad Russell Cruz, Gianpietro Dotti, Stephen Gottschalk, Vicky Torrano, Olga Dakhova, et al. 2018. « Tumor-Specific T-Cells Engineered to Overcome Tumor Immune Evasion Induce Clinical Responses in Patients With Relapsed Hodgkin Lymphoma ». *Journal of Clinical Oncology* 36 (11): 1128-44. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.3179>.
- Boomer, J. S., et J. M. Green. 2010. « An Enigmatic Tail of CD28 Signaling ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (8): a002436-a002436. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002436>.
- Borger, Jessica G., Andrew Filby, et Rose Zamoyska. 2013. « Differential Polarization of C-Terminal Src Kinase between Naive and Antigen-Experienced CD8+ T Cells ». *The Journal of Immunology* 190 (7): 3089-99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202408>.
- Bos, Paula D., George Plitas, Dipayan Rudra, Sue Y. Lee, et Alexander Y. Rudensky. 2013. « Transient Regulatory T Cell Ablation Deters Oncogene-Driven Breast Cancer and Enhances Radiotherapy ». *Journal of Experimental Medicine* 210 (11): 2435-66. <https://doi.org/10.1084/jem.20130762>.
- Bots, Michael, et Jan Paul. 2006. « Granzymes at a glance ». *Journal of cell science* 119: 5011-14. <https://doi.org/10.1242/jcs.03239>.
- Boucard-Jourdin, Mathilde, David Kugler, Marie-Laure Endale Ahanda, Sébastien This, Jaime De Calisto, Ailiang Zhang, J. Rodrigo Mora, et al. 2016. « B8 Integrin Expression and Activation of TGF- β by Intestinal Dendritic Cells Are Determined by Both Tissue Microenvironment and Cell Lineage ». *The Journal of Immunology* 197 (5): 1968-78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600244>.
- Bouillet, Philippe, Jared F. Purton, Dale I. Godfrey, Li-Chen Zhang, Leigh Coultas, Hamsa Puthalakath, Marc Pellegrini, Suzanne Cory, Jerry M. Adams, et Andreas Strasser. 2002. « BH3-Only Bcl-2 Family Member Bim Is Required for Apoptosis of Autoreactive Thymocytes ». *Nature* 415 (6874): 922-26. <https://doi.org/10.1038/415922a>.

- Boyman, Onur, et Jonathan Sprent. 2012. « The Role of Interleukin-2 during Homeostasis and Activation of the Immune System ». *Nature Reviews Immunology* 12 (3): 180-90. <https://doi.org/10.1038/nri3156>.
- Briesemeister, Dana, Daniel Sommermeyer, Christoph Loddenkemper, Rainer Loew, Wolfgang Uckert, Thomas Blankenstein, et Thomas Kammertoens. 2010. « Tumor rejection by local interferon gamma induction in established tumors is associated with blood vessel destruction and necrosis ». *International Journal of Cancer* 128 (3): 371-78. <https://doi.org/10.1002/ijc.25350>.
- Brownlie, Rebecca J, Celine Garcia, Mate Ravasz, Dietmar Zehn, Robert J Salmond, et Rose Zamoyska. 2017. « Resistance to TGF β suppression and improved anti-tumor responses in CD8+ T cells lacking PTPN22 ». *Nature Communications* 8 (1343): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01427-1>.
- Bunnell, Stephen C, Maximilian Diehn, Michael B Yaffe, Paul R Findell, Lewis C Cantley, et Leslie J Berg. 2000. « Biochemical Interactions Integrating Itk with the T Cell Receptor-initiated Signaling Cascade * ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (3): 2219-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.2219>.
- Burchill, Matthew A., Jianying Yang, Kieng B. Vang, et Michael A. Farrar. 2007. « Interleukin-2 Receptor Signaling in Regulatory T Cell Development and Homeostasis ». *Immunology Letters* 114 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.08.005>.
- Burkholder, Brett, Ren-yu Huang, Rob Burgess, Shuhong Luo, Valerie Sloane, Wenji Zhang, Zhi-qiang Lv, et al. 2014. « Biochimica et Biophysica Acta Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks ». *BBA - Reviews on Cancer* 1845 (2): 182-201. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.01.004>.
- Burroughs, Nigel J., Zorana Lazic, et P. Anton van der Merwe. 2006. « Ligand Detection and Discrimination by Spatial Relocalization: A Kinase-Phosphatase Segregation Model of TCR Activation ». *Biophysical Journal* 91 (5): 1619-29. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.080044>.
- Calon, Alexandre, Elisa Espinet, Sergio Palomo-Ponce, Daniele V. F. Tauriello, Mar Iglesias, María Virtudes Céspedes, Marta Sevillano, et al. 2012. « Dependency of Colorectal Cancer on a TGF- β -Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation ». *Cancer Cell* 22 (5): 571-84. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.013>.
- Canel, Marta, David Taggart, Andrew H Sims, David W Lonergan, Irene C Waizenegger, et Alan Serrels. 2020. « T-cell co-stimulation in combination with targeting FAK drives enhanced anti-tumor immunity ». *eLife*, 1-23.
- Cannons, Jennifer L., Peggy Lau, Birinder Ghuman, Mark A. DeBenedette, Hideo Yagita, Ko Okumura, et Tania H. Watts. 2001. « 4-1BB Ligand Induces Cell Division, Sustains Survival, and Enhances Effector Function of CD4 and CD8 T Cells with Similar Efficacy ». *The journal of immunology* 167 (3): 1313-24.
- Capone, Myriam, Richard D Jr Hockett, et Albert Zlotnik. 1998. « Kinetics of T cell receptor b, g, and d rearrangements during adult thymic development : T cell receptor rearrangements are present in CD44+ CD25+ Pro-T thymocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (October): 12522-27.
- Cawthon, Andrew G., et Martha A. Alexander-Miller. 2002. « Optimal Colocalization of TCR and CD8 as a Novel Mechanism for the Control of Functional Avidity ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (7): 3492-98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3492>.

- Cells, T, Toshiro Hirai, Yukari Zenke, Yi Yang, Laurent Bartholin, Lalit K Beura, David Masopust, et al. 2019. « Keratinocyte-Mediated Activation of the Cytokine TGF- β Maintains Skin Recirculating Memory CD8⁺ T Cells ». *Immunity* 50 (5): 1249-1261.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.002>.
- Cerami, Ethan, Jianjiong Gao, Ugur Dogrusoz, Benjamin E. Gross, Selcuk Onur Sumer, Bülent Arman Aksoy, Anders Jacobsen, et al. 2012. « The CBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data ». *Cancer Discovery* 2 (5): 401-4. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>.
- Chaikuad, Apirat, et Alex N. Bullock. 2016. « Structural Basis of Intracellular TGF- β Signaling: Receptors and Smads ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (11): a022111. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022111>.
- Chakraborty, Arup K, et Arthur Weiss. 2014. « Insights into the Initiation of TCR Signaling ». *Nature Immunology* 15 (9): 798-807. <https://doi.org/10.1038/ni.2940>.
- Chapman, Nicole M., Sean F. Connolly, Erin L. Reinl, et Jon C. D. Houtman. 2013. « Focal Adhesion Kinase Negatively Regulates Lck Function Downstream of the T Cell Antigen Receptor ». *The Journal of Immunology* 191 (12): 6208-21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301587>.
- Chapman, Nicole M., Sean F. Connolly, Erin L. Reinl, et Jon C.D. Houtman. 2014. « Focal adhesion kinase negatively regulates Lck function downstream of the T cell antigen receptor ». *The journal of immunology* 191 (12): 1-28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301587>.
- Cheifetz, S, T Bellón, C Calés, S Vera, C Bernabeu, J Massagué, et M Letarte. 1992. « Endoglin Is a Component of the Transforming Growth Factor-Beta Receptor System in Human Endothelial Cells. ». *Journal of Biological Chemistry* 267 (27): 19027-30. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41732-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41732-2).
- Chen, Lieping, et Dallas B Flies. 2013. « Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition ». *Nature Reviews Immunology* 13 (April): 227-42. <https://doi.org/10.1038/nri3405>.
- Chen, Lin, J. N. Mark Glover, Patrick G. Hogan, Anjana Rao, et Stephen C. Harrison. 1998. « Structure of the DNA-Binding Domains from NFAT, Fos and Jun Bound Specifically to DNA ». *Nature* 392 (6671): 42-48. <https://doi.org/10.1038/32100>.
- Chen, WanJun, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, et Sharon M. Wahl. 2003. « Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3 ». *Journal of Experimental Medicine* 198 (12): 1875-86. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>.
- Cheuk, Stanley, Heinrich Schlums, Irène Gallais Sérézal, Elisa Martini, Samuel C. Chiang, Nicole Marquardt, Anna Gibbs, et al. 2017. « CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8⁺ T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin ». *Immunity* 46 (2): 287-300. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.009>.
- Choi, Beom K., Jun S. Bae, Eun M. Choi, Woo J. Kang, Shimon Sakaguchi, Dass S. Vinay, et Byoung S. Kwon. 2004. « 4-1BB-Dependent Inhibition of Immunosuppression by Activated CD4⁺CD25⁺ T Cells ». *Journal of Leukocyte Biology* 75 (5): 785-91. <https://doi.org/10.1189/jlb.1003491>.

- Cooper, David, Pratima Bansal-Pakala, et Michael Croft. 2002. « 4-1BB (CD137) Controls the Clonal Expansion and Survival of CD8 T Cells in Vivo but Does Not Contribute to the Development of Cytotoxicity ». *European Journal of Immunology* 32 (2): 521-29. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200202\)32:2<521::AID-IMMU521>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200202)32:2<521::AID-IMMU521>3.0.CO;2-X).
- Coulie, Pierre G, Benoît J Van Den Eynde, et Pierre Van Der Bruggen. 2014. « Tumour antigens recognized by T lymphocytes : at the core of cancer immunotherapy ». *Nature Reviews Cancer* 14 (2): 135-46. <https://doi.org/10.1038/nrc3670>.
- Courau, Tristan, Djamel Nehar-Belaid, Laura Florez, Béatrice Levacher, Thomas Vazquez, Faustine Brimaud, Bertrand Bellier, et David Klatzmann. 2016. « TGF- β and VEGF Cooperatively Control the Immunotolerant Tumor Environment and the Efficacy of Cancer Immunotherapies ». *JCI Insight* 1 (9): e85974. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85974>.
- Crawford, Alison, Jill M Angelosanto, Charlyl Kao, Travis A Doering, Pamela M Odorizzi, Burton E Barnett, et E John Wherry. 2014. « Resource Molecular and Transcriptional Basis of CD4 + T Cell Dysfunction during Chronic Infection ». *Immunity* 40 (2): 289-302. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.005>.
- Curiel, Tyler J, Shuang Wei, Haidong Dong, Xavier Alvarez, Pui Cheng, Peter Mottram, Roman Krzysiek, et al. 2003. « Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell – mediated antitumor immunity ». *Nature medicine* 9 (5): 562-67. <https://doi.org/10.1038/nm>.
- Curtsinger, Julie M, Javier O Valenzuela, Pujya Agarwal, et Debra Lins. 2005. « Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation ». *The journal of immunology* 174 (8): 4465-69.
- Cyster, Jason G. 1999. « Chemokines and the Homing of Dendritic Cells to the T Cell Areas of Lymphoid Organs ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (3): 447-50.
- Davis, Simon J., et P. Anton van der Merwe. 2011. « Lck and the Nature of the T Cell Receptor Trigger ». *Trends in Immunology* 32 (1): 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.11.003>.
- Deheuninck, Julien, et Kunxin Luo. 2009. « Ski and SnoN, Potent Negative Regulators of TGF- β Signaling ». *Cell Research* 19 (1): 47-57. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.324>.
- Derynck, Rik, Shannon J. Turley, et Rosemary J. Akhurst. 2021. « TGF β Biology in Cancer Progression and Immunotherapy ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 18 (1): 9-34. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0403-1>.
- Derynck, Rik, et Ying E. Zhang. 2003. « Smad-Dependent and Smad-Independent Pathways in TGF-Beta Family Signalling ». *Nature* 425 (6958): 577-84. <https://doi.org/10.1038/nature02006>.
- Dhatchinamoorthy, Karthik, Jeff D. Colbert, et Kenneth L. Rock. 2021. « Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation ». *Frontiers in Immunology* 12 (mars): 636568. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636568>.
- Dickson, Marion C, Julie S Martin, Frances M Cousins, Ashok B Kulkarni, Stefan Karlsson, et Rosemary J Akhurst. 1995. « Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- β 1 knock out mice » 1854: 1845-54.
- Dodagatta-Marri, Eswari, Hsiao-Yen Ma, Benjia Liang, John Li, Dominique S. Meyer, Szu-Ying Chen, Kai-Hui Sun, et al. 2021. « Integrin avb8 on T cells suppresses anti-tumor immunity in multiple models and is a promising target for tumor immunotherapy ». *CellReports* 36 (1): 109309. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109309>.
- Doisne, Jean-marc, Laurent Bartholin, Kai-ping Yan, Céline N Garcia, Nadia Duarte, Jean-benoît Le Luduec, David Vincent, et al. 2009. « iNKT cell development is orchestrated

- by different branches of TGF- β signaling ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (6): 1365-78. <https://doi.org/10.1084/jem.20090127>.
- Donkor, Moses K., Abira Sarkar, Peter A. Savage, Ruth A. Franklin, Linda K. Johnson, Achim A. Jungbluth, James P. Allison, et Ming O. Li. 2011. « T Cell Surveillance of Oncogene-Induced Prostate Cancer Is Impeded by T Cell-Derived TGF- β 1 Cytokine ». *Immunity* 35 (1): 123-34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.04.019>.
- Duan, Zelin, Xuezheng Lin, Lixia Wang, Qiuxin Zhen, Yuefeng Jiang, Chuxin Chen, Jing Yang, et al. 2022. « Specificity of TGF- β 1 signal designated by LRRC33 and integrin α V β 8 ». *Nature Communications*, n° 66. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32655-9>.
- Dubois, Claire M, Marie-helene Lapzisejz, Franeois Blanehettez, Larry E Gentryll, et Richard Leduc. 1995. « Processing of Transforming Growth Factor 131 Precursor by Human Furin Convertase * » 270 (18): 10618-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10618>.
- Dubois, Claire M, et Richard Leduc. 2001. « Evidence that Furin Is an Authentic Transforming Growth Factor- β 1-Converting Enzyme » 158 (1): 305-16. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63970-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63970-3).
- Dudek, Aleksandra M, Abhishek D Garg, Dmitri V Krysko, Dirk De Ruyscher, et Patrizia Agostinis. 2013. « Cytokine & Growth Factor Reviews Inducers of immunogenic cancer cell death ». *Cytokine and Growth Factor Reviews* 24 (4): 319-33. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.01.005>.
- Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, et Robert D. Schreiber. 2002. « Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape ». *Nature Immunology* 3 (11): 991-98. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
- Dunn, Gavin P, Lloyd J Old, et Robert D Schreiber. 2004. « THE THREE ES OF CANCER IMMUNOEDITING Gavin ». *Annual review of immunology* 22 (4): 329-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>.
- Dustin, Michael L., et David Depoil. 2011. « New Insights into the T Cell Synapse from Single Molecule Techniques ». *Nature Reviews. Immunology* 11 (10): 672-84. <https://doi.org/10.1038/nri3066>.
- Fontenot, Jason D, James L Dooley, Andrew G Farr, et Alexander Y Rudensky. 2005. « Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny » 202 (7): 901-6. <https://doi.org/10.1084/jem.20050784>.
- Fontenot, Jason D, Jeffrey P Rasmussen, Marc A Gavin, et Alexander Y Rudensky. 2005. « A Function for Interleukin 2 in Foxp3-Expressing Regulatory T Cells ». *Nature Immunology* 6 (11): 1142-51. <https://doi.org/10.1038/ni1263>.
- Freedden-jeffry, Ursula Von, Paulo Vieira, Linda A Lucian, Tom McNeil, Stefan E G Burdach, et Richard Murray. 1995. « Lymphopenia in Interleukin (IL)-7 Gene-deleted Mice Identifies IL-7 as a Nonredundant Cytokine ». *The Journal of Experimental Medicine* 181 (April): 1519-26.
- Fuertes, Mercedes B, Aalok K Kacha, Justin Kline, Seng-ryong Woo, David M Kranz, Kenneth M Murphy, et Thomas F Gajewski. 2011. « Host type I IFN signals are required for antitumor CD8 + T cell responses through CD8 α + dendritic cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 208 (10): 2005-16. <https://doi.org/10.1084/jem.20101159>.
- Fugmann, Sebastian D, David G Schatz, et New Haven. 2001. « Identification of Basic Residues in RAG2 Critical for DNA Binding by the RAG1-RAG2 Complex » 8: 899-910.
- Fukuchi, Minoru, Takeshi Imamura, Tomoki Chiba, Takanori Ebisawa, Masahiro Kawabata, Keiji Tanaka, et Kohei Miyazono. 2001. « Ligand-dependent Degradation of Smad3 by a Ubiquitin Ligase Complex of ROC1 and Associated Proteins » 12 (May): 1431-43.

- Fuse, Shinichiro, Weijun Zhang, et Edward J. Usherwood. 2010. « Control of Memory CD8+ T Cell Differentiation by CD80/CD86-CD28 Costimulation and Restoration by IL-2 during the Recall ». *The journal of immunology* 180 (2): 1148-57.
- Futagawa, Toshiro, Hisaya Akiba, Tomohiro Kodama, Kazuyoshi Takeda, Yasuyuki Hosoda, Hideo Yagita, et Ko Okumura. 2002. « Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells » 14 (3): 275-86.
- GABRILOVICH, DMITRY I., HAILEI L. CHEN, KHALED R. GIRGIS, H. THOMAS CUNNINGHAM, GERALYN M. MENY, SORENA NADAF, DENISE KAVANAUGH, et P.CARBONE DAVID. 1996. « Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells ». *Nature medicine* 2 (10): 1096-1103.
- Gao, Jianjiong, Bülent Arman Aksoy, Ugur Dogrusoz, Gideon Dresdner, Benjamin Gross, S. Onur Sumer, Yichao Sun, et al. 2013. « Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the CBioPortal ». *Science Signaling* 6 (269): p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>.
- Garcia, K Christopher. 2012. « Reconciling views on T cell receptor germline bias for MHC ». *Trends in Immunology* 33 (9): 429-36. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.05.005>.
- Gasser, Martin, Martin Grimm, Mia Kim, Andreas Rosenwald, Christoph Germer, Ana Maria, Waaga Gasser, et al. 2010. « Toll-like Receptor (TLR) 7 and TLR8 Expression in CD133 + Cells in Colorectal Cancer Points to a Specific Role for Inflammation Induced TLRs in Tumorigenesis and Tumor Progression ». *Clinical Immunology* 135: S60-61. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.03.185>.
- Giroux, Martin, Jean-Sébastien Delisle, Alan O'Brien, Marie-Josée Hébert, et Claude Perreault. 2010. « T Cell Activation Leads to Protein Kinase C θ -Dependent Inhibition of TGF- β Signaling ». *The journal of immunology* 185 (3): 1568-76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000137>.
- Gonzalez, Hugo, Catharina Hagerling, et Zena Werb. 2018. « Roles of the immune system in cancer : from tumor initiation to metastatic progression », 1267-84. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118.tissue>.
- Gorelik, Leonid, Stephanie Constant, et Richard A Flavell. 2002. « Mechanism of Transforming Growth Factor b- induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation ». *The Journal of Experimental Medicine* 195 (11): 1499-1505. <https://doi.org/10.1084/jem.20012076>.
- Gorelik, Leonid, Patrick E Fields, et Richard A Flavell. 2000. « TGF-b Inhibits Th Type 2 Development Through Inhibition of GATA-3 Expression ». *The journal of immunology* 165 (9): 4773-77.
- Gorelik, Leonid, et Richard A Flavell. 2001a. « Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in T cells ». *Nature Medicine* 7 (10): 1118-22.
- Gorelik, Leonid, et Richard A. Flavell. 2001b. « Immune-Mediated Eradication of Tumors through the Blockade of Transforming Growth Factor- β Signaling in T Cells ». *Nature Medicine* 7 (10): 1118-22. <https://doi.org/10.1038/nm1001-1118>.
- Gorelik, Leonid, Richard A Flavell, et New Haven. 2000. « Abrogation of TGF β Signaling in T Cells Leads to Spontaneous T Cell Differentiation and Autoimmune Disease » 12: 171-81.
- Graf, Beth, Timothy Bushnell, et Jim Miller. 2007. « LFA-1-Mediated T Cell Costimulation through Increased Localization of TCR/Class II Complexes to the Central Supramolecular Activation Cluster and Exclusion of CD45 from the Immunological

- Synapse ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (3): 1616-24.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1616>.
- Gray, Daniel H D, Fiona Kupresanin, Stuart P Berzins, Marco J Herold, Lorraine A O Reilly, et Philippe Bouillet. 2012. « Article The BH3-Only Proteins Bim and Puma Cooperate to Impose Deletional Tolerance of Organ-Specific Antigens ». *Immunity* 37 (3): 451-62.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.030>.
- Grujic, Mirjana, Christina Bartholdy, Melissa Remy, Daniel D Pinschewer, Jan P Christensen, et Allan R Thomsen. 2010. « The Role of CD80/CD86 in Generation and Maintenance of Functional Virus-Specific CD8 + T Cells in Mice Infected with Lymphocytic Choriomeningitis Virus » 2. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903894>.
- Guerin, Marion V, Fabienne Regnier, Vincent Feuillet, Lene Vimeux, Julia M Weiss, Georges Bismuth, Gregoire Altan-bonnet, et al. 2019. « TGF β blocks IFN α/β release and tumor rejection in spontaneous mammary tumors Marion ». *Nature Communications* 10 (431): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11998-w>.
- Guinn, Zachary, Deborah M Brown, et Thomas M Petro. 2017. « Activation of IRF3 contributes to IFN-g and ISG54 expression during the immune responses to B16F10 tumor growth ». *International Immunopharmacology*, n^o 9: 121-29.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.06.016>.Activation.
- Gunderson, Andrew J, Tomoko Yamazaki, Kayla Mccarty, Nathaniel Fox, Michaela Phillips, Alejandro Alice, Tiffany Blair, et al. 2020. « TGF β suppresses CD8 + T cell expression of CXCR3 and tumor trafficking ». *Nature Communications* 11 (1749): 1-13.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15404-8>.
- Guy, Clifford, Diana M Mitrea, Po-chien Chou, Jamshid Temirov, Kate M Vignali, Xueyan Liu, Hui Zhang, Richard Kriwacki, Marcel P Bruchez, et Simon C Watkins. 2022. « LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation ». *Nature immunology* 23 (May). <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01176-4>.
- Gyori, David, Len R Stephens, Phillip T Hawkins, David Gyori, Ee Lyn Lim, Francis M Grant, Dominik Spensberger, et al. 2018. « Compensation between CSF1R + macrophages and Foxp3 + Treg cells drives resistance to tumor immunotherapy » 3 (11).
- Hadaschik, Eva N, Xiaoying Wei, Harald Leiss, Britta Heckmann, Birgit Niederreiter, Günter Steiner, Walter Ulrich, Alexander H Enk, Josef S Smolen, et Georg H Stummvoll. 2015. « Regulatory T cell-deficient scurfy mice develop systemic autoimmune features resembling lupus-like disease ». *Arthritis research & therapy*, 1-12.
<https://doi.org/10.1186/s13075-015-0538-0>.
- Halle, Stephan, Olga Halle, et Reinhold Förster. 2017. « Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo ». *Trends in Immunology* xx: 1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.002>.
- Halstead, E Scott, Yvonne M Mueller, John D Altman, et Peter D Katsikis. 2002. « In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8 + T cell responses » 3 (6).
<https://doi.org/10.1038/ni798>.
- Hanahan, Douglas. 2022. « Hallmarks of Cancer : New Dimensions », n^o January: 31-46.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- Harder, Thomas, et Marina Kuhn. 2000. « Selective Accumulation of Raft-Associated Membrane Protein Lat in T Cell Receptor Signaling Assemblies ». *Journal of Cell Biology* 151 (2): 199-208. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.199>.

- Haribhai, Dipica, Jason B Williams, Shuang Jia, Derek Nickerson, Erica G Schmitt, Brandon Edwards, Jennifer Ziegelbauer, et al. 2011. « Article A Requisite Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity ». *Immunity* 35 (1): 109-22. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.029>.
- Hayes, Sandra M, Renee M Laird, et Paul E Love. 2010. « Beyond ab/gd lineage commitment : TCR signal strength regulates gd T cell maturation and effector fate ». *Seminars in Immunology* 22 (4): 247-51. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2010.04.006>.
- Hayes, Sandra M, Liqi Li, et Paul E Love. 2005. « TCR Signal Strength Influences ab/gd Lineage Fate ». *Immunity* 22: 583-93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.014>.
- He, Wei, David C Dorn, Hediye Erdjument-bromage, Paul Tempst, Malcolm A S Moore, et Joan Massague. 2006. « Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1 g and Smad4 Branches of the TGF b Pathway », 929-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.045>.
- Hernàndez-Munain, Cristina, Barry P Sleckman, et Michael S Krangel. 1999. « A Developmental Switch from TCRd Enhancer to TCRA Enhancer Function during Thymocyte Maturation ». *Immunity* 10: 723-33.
- Hinterberger, Maria, Gerald Wirnsberger, Ludger Klein, Peter M Van Endert, et Université Paris. 2011. « B7 / CD28 in central tolerance : costimulation promotes maturation of regulatoryT cell precursors and prevents their clonal deletion » 2 (July): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00030>.
- Hof, Wouter Van, et Marilyn D Resh. 1999. « Dual Fatty Acylation of p59 Fyn Is Required for Association with the T Cell Receptor zeta Chain through Phosphotyrosine–Src Homology Domain-2 Interactions ». *The Journal of Cell Biology* 145 (2): 377-89.
- Hombach, Andreas, Markus Barden, Lisa Hannappel, Markus Chmielewski, Gunter Rapp, Agapios Sachinidis, et Hinrich Abken. 2022. « IL12 integrated into the CAR exodomain converts CD8 + T cells to poly-functional NK-like cells with superior killing of antigen-loss tumors ». *Molecular Therapy* 30 (2): 593-605. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.10.011>.
- Hope, Helen Carrasco, Gabriella Pickersgill, Pierpaolo Ginefra, Nicola Vannini, Graham P Cook, et Robert J Salmond. 2022. « TGF b limits Myc-dependent TCR-induced metabolic reprogramming in CD8 + T cells ». *Frontiers in Immunology*, n° July: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.913184>.
- Horkova, Veronika, Ales Drobek, Darina Paprckova, Veronika Niederlova, Avishek Prasai, Valeria Uleri, Daniela Glatzova, et al. 2022. « Unique roles of co-receptor-bound LCK in helper and cytotoxic T cells ». *Nature immunology* 24 (January). <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01366-0>.
- Huber, Eva M, Michael Basler, Ricarda Schwab, Wolfgang Heinemeyer, Christopher J Kirk, Marcus Groettrup, et Michael Groll. 2012. « Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity ». *Cell* 148 (4): 727-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.030>.
- Hunter, Christopher A. 2005. « REVIEWS DIVERGENT FUNCTIONS ». *Nature Reviews Immunology* 5: 521-31. <https://doi.org/10.1038/nri1648>.
- Huse, Morgan, Michael J Eck, et Stephen C Harrison. 1998. « A Zn 2 Ion Links the Cytoplasmic Tail of CD4 and the N-terminal Region of Lck * ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (30): 18729-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.30.18729>.

- Huse, Morgan, Tom W Muir, Lan Xu, Ye-guang Chen, John Kuriyan, et Joan Massague. 2001. « The TGF β Receptor Activation Process : An Inhibitor- to Substrate-Binding Switch » 8: 671-82.
- Igalouzene, Ramdane, Hector Hernandez-vargas, Nicolas Benech, Alexandre Guyennon, David Bauché, Célia Barrachina, Emeric Dubois, Julien C Marie, et Saïdi M Homa Soudja. 2022. « SMAD4 TGF- β – independent function preconditions naive CD8 + T cells to prevent severe chronic intestinal inflammation ». *The Journal of Clinical Investigation* 132 (8): 1-19.
- Ikeda, Masafumi, Manabu Morimoto, Masaomi Tajimi, Koichi Inoue, Karim A. Benhadji, Micheal M.F Lahn, et Daisuke Sakai. 2019. « A phase 1b study of transforming growth factor-beta receptor I inhibitor galunisertib in combination with sorafenib in Japanese patients with unresectable hepatocellular carcinoma ». *Investigational New Drugs*, 118-26.
- Irles, Claudine, Antony Symons, Frédérique Michel, Talitha R Bakker, P Anton Van Der Merwe, et Oreste Acuto. 2003. « CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling » 4 (2): 189-97. <https://doi.org/10.1038/ni877>.
- Jalah, Rashmi, Margherita Rosati, Brunda Ganneru, Guy R Pilkington, Antonio Valentin, Viraj Kulkarni, Cristina Bergamaschi, et al. 2013. « The p40 Subunit of Interleukin (IL) -12 Promotes Stabilization and Export of the p35 Subunit ». *The Journal of biological chemistry* 288 (9): 6763-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436675>.
- Jaleco, Ana C, Hélio Neves, Erik Hooijberg, Paula Gameiro, Nuno Clode, Matthias Haury, et Domingos Henrique. 2001. « Differential Effects of Notch Ligands Delta-1 and Jagged-1 in Human Lymphoid Differentiation » 194 (7).
- Johnson, Lisa D S, et Stephen C Jameson. 2012. « TGF- β Sensitivity Restrains CD8 + T Cell Homeostatic Proliferation by Enforcing Sensitivity to IL-7 and IL-15 » 7 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042268>.
- Jordan, Martha S, Andrew L Singer, et Gary A Koretzky. 2003. « Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells » 4 (2).
- Junaliah, Ma, Tuazon Kels, Esther Ng, Zahrah Al, Pratikshya Pandey, et Sigrid R Ruuls. 2020. « TNF deficiency dysregulates inflammatory cytokine production , leading to lung pathology and death during respiratory poxvirus infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (27): 15935-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004615117>.
- June, Carl H, Jeffrey A Ledbetter, Peter S Unsley, et Craig B Thompson. 1990. « Role of the CD28 receptor in T-cell activation ». *Immunology today* 1 (6): 211-16.
- Kaer, Luc Van. 2001. « Accessory Proteins that Control the Assembly of MHC Molecules with Peptides », 205-14.
- Kammertoens, Thomas, Christian Friese, Ainhoa Arina, Christian Idel, Dana Briesemeister, Michael Rothe, Andranik Ivanov, et al. 2017. « Tumour ischaemia by interferon- γ resembles physiological blood vessel regression ». *Nature* 545 (5): 98-114. <https://doi.org/10.1038/nature22311>.
- Karin, Nathan. 2020. « CXCR3 Ligands in Cancer and Autoimmunity , Chemoattraction of Effector T Cells , and Beyond ». *Frontiers in Immunology* 11 (May): 1-9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00976>.
- Keefe, Dennis, Lianfa Shi, Stefan Feske, Ramiro Massol, Francisco Navarro, Tomas Kirchhausen, et Judy Lieberman. 2005. « Perforin Triggers a Plasma Membrane-

- Repair Response that Facilitates CTL Induction of Apoptosis » 23: 249-62.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.001>.
- Kerdiles, Yann M, Erica L Stone, Daniel L Beisner, Maureen A McGargill, Irene L Ch, Christian Stockmann, Carol D Katayama, et Stephen M Hedrick. 2010. « Foxo Transcription Factors Control Regulatory T Cell Development and Function ». *Immunity* 33 (6): 890-904. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.002>.
- Kim, Byung-Gyu, Ehsan Malek, Sung Hee Choi, James J. Ignatz-Hoover, et James J. Driscoll. 2021. « Novel Therapies Emerging in Oncology to Target the TGF- β Pathway ». *Journal of Hematology & Oncology* 14 (1): 55. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01053-x>.
- Kim, J.M, et D.S Chen. 2016. « Immune escape to PD-L1 / PD-1 blockade : seven steps to success (or failure) ». *Annals of Oncology* 27 (8): 1492-1504.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdw217>.
- Kim, Young H., Beom K. Choi, Su M. Shin, Chang H. Kim, Ho S. Oh, Sang H. Park, Don G. Lee, et al. 2011. « 4-1BB Triggering Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Modulating the Balance between Th17 and Regulatory T Cells ». *The journal of immunology* 187 (3): 1120-28.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002681>.
- Klein, Ludger, Bruno Kyewski, Paul M Allen, et Kristin A Hogquist. 2014. « Positive and negative selection of the T cell repertoire : what thymocytes see (and don ' t see) ». *Nature Reviews Immunology* 14 (June). <https://doi.org/10.1038/nri3667>.
- Koch, Meghan A, Gladys Tucker-Heard, Nikole R Perdue, Justin R Killebrew, Kevin B Urdahl, Daniel J Campbell, et Nature America. 2009. « The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation » 10 (6).
<https://doi.org/10.1038/ni.1731>.
- Kolumam, Ganesh A, Sunil Thomas, Lucas J Thompson, Jonathan Sprent, et Kaja Murali-krishna. 2005. « Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection » 202 (5).
<https://doi.org/10.1084/jem.20050821>.
- Kotlarz, Daniel, Benjamin Marquardt, Tuva Barøy, Way S Lee, Liza Konnikova, Sebastian Hollizeck, Thomas Magg, et al. 2018. « Human TGF- β 1 deficiency causes severe inflammatory bowel disease and encephalopathy ». *Nature Genetics* 50 (March).
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0063-6>.
- Krueger, Andreas, Stefanie Willenzon, Marcin Łyszkiewicz, Elisabeth Kremmer, et Reinhold Förster. 2010. « CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus ». *Blood* 115 (10): 1906-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235721>.
- Kryczek, Ilona, Linhua Zou, Paulo Rodriguez, Gefeng Zhu, Shuang Wei, Peter Mottram, Michael Brumlik, et al. 2006. « B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma » 203 (4): 0-10.
<https://doi.org/10.1084/jem.20050930>.
- Ku, Thomas M, Arda Shahinian, Kazuhiro Kawai, Hans-willi Mittrü, Eric Sebzda, Martin F Bachmann, Tak W Mak, et Pamela S Ohashi. 1996. « Duration of TCR Stimulation Determines Costimulatory Requirement of T Cells » 5: 41-52.
- Kulkarni, Ashok B, Chang-goo Huh, Dean Becker, Andrew Geisert, Marion Lyght, Kathleen C Flanderst, Anita B Robertst, Michael B Spornst, Jerrold M Wardt, et Stefan Karlsson. 1993. « Transforming growth factor b1 null mutation in mice causes excessive

- inflammatory response and early death ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (January): 770-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.770>.
- Kumari, Neeraj, B. S. Dwarakanath, Asmita Das, et Anant Narayan Bhatt. 2016. « Role of Interleukin-6 in Cancer Progression and Therapeutic Resistance ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (9): 11553-72. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7>.
- Lainé, Alexandra, Ossama Labiad, Hector Hernandez-vargas, Sébastien This, Amélien Sanlaville, Sophie Léon, Stéphane Dalle, et al. 2021. « Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin $\alpha\beta 8$ -mediated TGF- β activation ». *Nature Communications* 12 (6228): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26352-2>.
- Lainé, Alexandra, Ossama Labiad, Hector Hernandez-Vargas, Sébastien This, Amélien Sanlaville, Sophie Léon, Stéphane Dalle, et al. 2021. « Regulatory T Cells Promote Cancer Immune-Escape through Integrin $\alpha\beta 8$ -Mediated TGF- β Activation ». *Nature Communications* 12 (1): 6228. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26352-2>.
- Lan, Yan, Dong Zhang, Chunxiao Xu, Kenneth W Hance, Bo Marelli, Jin Qi, Huakui Yu, et al. 2018. « Enhanced preclinical antitumor activity of M7824 , a bifunctional fusion protein simultaneously targeting PD-L1 and TGF- β ». *Science translational medicine*, 1-15.
- Lee, Do Y, Beom K Choi, Don G Lee, Young H Kim, Chang H Kim, Seung J Lee, et Byoung S Kwon. 2013. « 4-1BB Signaling Activates the T Cell Factor 1 Effector / b - Catenin Pathway with Delayed Kinetics via ERK Signaling and Delayed PI3K / AKT Activation to Promote the Proliferation of CD8 + T Cells » 8 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069677>.
- Lee, Gap Ryol. 2018. « The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (11): 1-14. <https://doi.org/10.3390/ijms19030730>.
- Lee, Hyeon-Woo, Su-Jung Park, Beom K. Choi, Hyun Hwa Kim, Kyung-Ok Nam, et Byoung S. Kwon. 2002. « 4-1BB Promotes the Survival of CD8 + T Lymphocytes by Increasing Expression of Bcl-xL and Bfl-1 ». *Journal of immunology* 169 (9): 4882-88.
- Lejeune, Ferdy J, Danielle Liénard, Maurice Matter, et Curzio Rüegg. 2006. « Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy » 6 (March): 1-17.
- Li, Chunxiao, Ping Jiang, Shuhua Wei, Xiaofei Xu, et Junjie Wang. 2020. « Regulatory T cells in tumor microenvironment : new mechanisms , potential therapeutic strategies and future prospects ». *Molecular Cancer*, 1-23.
- Li, Ju-pi, Chia-yu Yang, Huai-chia Chuang, Joung-liang Lan, Der-yuan Chen, Yi-ming Chen, Xiaohong Wang, Alice J Chen, John W Belmont, et Tse-hua Tan. 2014. « The phosphatase JKAP/DUSP22 inhibits T-cell receptor signalling and autoimmunity by inactivating Lck », 1-13. <https://doi.org/10.1038/ncomms4618>.
- Li, Ming O, Shomyseh Sanjabi, et Richard A Flavell. 2006a. « Transforming Growth Factor- b Controls Development , Homeostasis , and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms », n° September: 455-71. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.011>.
- Li, Ming O., Shomyseh Sanjabi, et Richard A. Flavell. 2006b. « Transforming Growth Factor- β Controls Development, Homeostasis, and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms ». *Immunity* 25 (3): 455-71. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.011>.

- Liakou, Chrysoula I, Ashish Kamat, Derek Ng Tang, Hong Chen, Jingjing Sun, Patricia Troncoso, Christopher Logothetis, et Padmanee Sharma. 2008. « CTLA-4 blockade increases IFN- γ producing CD4⁺ICOS⁺ cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (9): 14987-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806075105>.
- Liao, Wei, Jian-xin Lin, et Warren J Leonard. 2011. « IL-2 family cytokines : new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation ». *Current Opinion in Immunology* 23 (5): 598-604. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.08.003>.
- Liberman, Judy, et Zusen Fan. 2003. « Nuclear war : the granzyme A-bomb ». *Current Opinion in Immunology* 15: 553-59. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00108-0](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00108-0).
- Lin, Ralph S, Carlos Rodriguez, et Harvey F Lodish. 1998. « Zinc Is Essential for Binding of p56 Lck to CD4 and CD8a ». *The Journal of biological chemistry* 273 (49): 32878-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32878>.
- Liu, Jie, Dan Xu, Jingming Li, Ning Gao, Chongbing Liao, Ruihua Jing, Bogang Wu, Bo Ma, Yongping Shao, et Cheng Pei. 2018. « The role of focal adhesion kinase in transforming growth factor- β 2 induced migration of human lens epithelial cells ». *International Journal of Molecular Medicine*, octobre. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3912>.
- Liu, Xiangdong, Niu Shin, Holly K Koblisch, Gengjie Yang, Qian Wang, Kathy Wang, Lynn Leffet, et al. 2010. « Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity ». *Blood* 115 (17): 3520-30. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-246124>.The.
- Liu, Yongzhong, Pin Zhang, Jun Li, Ashok B Kulkarni, Sylvain Perruche, et Wanjun Chen. 2008. « A critical function for TGF- β signaling in the regulatory T cells » 9 (6). <https://doi.org/10.1038/ni.1607>.
- Liu, Yuhong, Stephan Witte, Yun-cai Liu, Melissa Doyle, Chris Elly, et Amnon Altman. 2000. « Regulation of Protein Kinase C θ Function during T Cell Activation by Lck-mediated Tyrosine Phosphorylation * ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (5): 3603-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3603>.
- Liu, Yuying, Xiaoyu Liang, Xiaonan Yin, Jiadi Lv, Ke Tang, Jingwei Ma, Tiantian Ji, et al. 2017. « Blockade of IDO-kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN- γ -induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells ». *Nature Communications* 8 (May): 1-15. <https://doi.org/10.1038/ncomms15207>.
- Lo, Wan-lin, Neel H Shah, Nagib Ahsan, Veronika Horkova, Ondrej Stepanek, Arthur R Salomon, John Kuriyan, et Arthur Weiss. 2018. « Lck promotes Zap70-dependent LAT phosphorylation by bridging Zap70 to LAT ». *Nature Immunology* 19 (July). <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0131-1>.
- Love, Paul E, et Sandra M Hayes. 2010. « ITAM-mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor », 1-11.
- Lucas, Julie A, Julia Menke, Whitney A Rabacal, Frederick J Schoen, Arlene H Sharpe, et Vicki R Kelley. 2008. « for Autoimmune Myocarditis and Pneumonitis in MRL Mice 1 ». *The journal of immunology* 181 (4): 2513-21.
- Lyons, Russette M., Jorma Keski-Oja, et Harold L. Moses. 1988. « Proteolytic Activation of Latent Transforming Growth Factor- β from Fibroblast-conditioned Medium ». *The Journal of Cell Biology* 106 (May): 1659-65.

- Mackay, Laura K, Erica Wynne-jones, David Freestone, Daniel G Pellicci, Lisa A Mielke, Dane M Newman, Asolina Braun, et al. 2015. « T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF- β and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate ». *Immunity* 43 (6): 1101-11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.008>.
- Mahmud, Shawn A., Luke S. Manlove, et Michael A. Farrar. 2013. « Interleukin-2 and STAT5 in Regulatory T Cell Development and Function ». *JAK-STAT* 2 (1): e23154. <https://doi.org/10.4161/jkst.23154>.
- Malek, Thomas R. 2008. « The Biology of Interleukin-2 ». <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090357>.
- Mallis, Robert J, Ke Bai, Haribabu Arthanari, Rebecca E Hussey, Maris Handley, Zhenhai Li, et Loice Chingozha. 2015. « Pre-TCR ligand binding impacts thymocyte development before $\alpha\beta$ TCR expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (27): 8373-78. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504971112>.
- Mamalaki, C., J. Elliott, T. Norton, N. Yannoutsos, A. R. Townsend, P. Chandler, E. Simpson, et D. Kioussis. 1993. « Positive and Negative Selection in Transgenic Mice Expressing a T-Cell Receptor Specific for Influenza Nucleoprotein and Endogenous Superantigen ». *Developmental Immunology* 3 (3): 159-74. <https://doi.org/10.1155/1993/98015>.
- Mandal, Malay, Christine Borowski, Teresa Palomero, Adolfo A Ferrando, Philipp Oberdoerffer, Fanyong Meng, Antonio Ruiz-vela, et al. 2005. « The BCL2A1 gene as a pre – T cell receptor – induced regulator of thymocyte survival » 201 (4): 603-14. <https://doi.org/10.1084/jem.20041924>.
- Manz, Boryana N, Ying Xim Tan, Adam H Courtney, Florentine Rutaganira, Ed Palmer, Kevan M Shokat, et Arthur Weiss. 2015. « Small molecule inhibition of Csk alters affinity recognition by T cells », 1-12. <https://doi.org/10.7554/eLife.08088>.
- Marie, Julien C, Denny Liggitt, et Alexander Y Rudensky. 2006a. « Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor », n° September: 441-54. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.012>.
- Marie, Julien C., Denny Liggitt, et Alexander Y. Rudensky. 2006b. « Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor ». *Immunity* 25 (3): 441-54. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.012>.
- Martin, Constance J, Abhishek Datta, Christopher Littlefield, Ashish Kalra, Christopher Chapron, Stefan Wawersik, Kevin B Dagbay, et al. 2020. « Selective inhibition of TGF β 1 activation overcomes primary resistance to checkpoint blockade therapy by altering tumor immune landscape ». *Science translational medicine* 8456: 1-16.
- Martin, Margarita, Helga Schneider, Abdallah Azouz, et Christopher E Rudd. 2001. « Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 and CD28 Modulate Cell Surface Raft Expression in Their Regulation of T Cell Function » 194 (11).
- Maruyama, Takashi, Jun Li, Jose P Vaque, Joanne E Konkol, Weifeng Wang, Baojun Zhang, Pin Zhang, et al. 2011. « Control of the differentiation of regulatory T cells and T H 17 cells by the DNA-binding inhibitor Id3 ». *Nature Publishing Group* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/ni.1965>.
- Masli, Sharmila, et Jose L. Vega. 2011. « Ocular Immune Privilege Sites ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 677: 449-58. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0_28.

- Massagué, J., et Y. G. Chen. 2000. « Controlling TGF-Beta Signaling ». *Genes & Development* 14 (6): 627-44.
- Massagué, J., et D. Wotton. 2000. « Transcriptional Control by the TGF-Beta/Smad Signaling System ». *The EMBO Journal* 19 (8): 1745-54.
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1745>.
- Matlung, Hanke L, Katka Szilagy, et A Barclay Timo. 2017. « The CD47- - SIRP α signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer » 276: 145-64.
<https://doi.org/10.1111/imr.12527>.
- Mattiuz, Raphaël, Carine Brousse, Marc Ambrosini, Jean-charles Cancel, Gilles Bessou, Julie Mussard, Amélien Sanlaville, et al. 2021. « Type 1 conventional dendritic cells and interferons are required for spontaneous CD4 + and CD8 + T-cell protective responses to breast cancer ». *Clinical & Translational Immunology* 10 (e1035): 1-19.
<https://doi.org/10.1002/cti2.1305>.
- Mccarron, Mark J, Magali Irla, Julien C Marie, et Saidi M Homa Soudja. 2019. « Transforming Growth Factor-beta signaling in $\alpha\beta$ thymocytes promotes negative selection ». *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13456-z>.
- McHugh, Rebecca S., Matthew J. Whitters, Ciriaco A. Piccirillo, Deborah A. Young, Ethan M. Shevach, Mary Collins, et Michael C. Byrne. 2002. « CD4(+)CD25(+) Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor ». *Immunity* 16 (2): 311-23.
[https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00280-7).
- McKarns, Susan C., Ronald H. Schwartz, et Norbert E. Kaminski. 2004. « Smad3 Is Essential for TGF- β 1 to Suppress IL-2 Production and TCR-Induced Proliferation, but Not IL-2-Induced Proliferation ». *The journal of immunology* 172 (7): 4275-84.
- McNeill, Louise, Robert J. Salmond, Joanne C. Cooper, Céline K. Carret, Robin L. Cassady-Cain, Marta Roche-Molina, Panna Tandon, Nick Holmes, et Denis R. Alexander. 2007. « The Differential Regulation of Lck Kinase Phosphorylation Sites by CD45 Is Critical for T Cell Receptor Signaling Responses ». *Immunity* 27 (3): 425-37.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.015>.
- Melero, Ignacio, Walter W Shuford, Stephanie Ashe Newby, Alejandro Aruffo, A Ledbetter, Karl Erik Hellstrom, Robert S Mittler, et Lieping Chen. 1997. « Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors ». *Nature medicine* 3 (6): 4-7.
- Mescher, Matthew F, Julie M Curtsinger, Kerry A Casey, et Christopher D Hammerbeck. 2006. « Signals required for programming effector and memory development by CD8 + T cells » 211: 81-92.
- Milstein, Oren, David Hagin, Assaf Lask, Shlomit Reich-Zeliger, Elias Shezen, Eran Ophir, Yaki Eidelstein, et al. 2011. « CTLs Respond with Activation and Granule Secretion When Serving as Targets for T-Cell Recognition ». *Blood* 117 (3): 1042-52.
<https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-283770>.
- Molina, T. J., K. Kishitlra, D. P. Siderovski, W. van Ewijk, A. Narendran, E. Timms, A. Wakeham, et al. 1992. « Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck ». *Nature* 357 (May): 161-64.
- Molina, Thierry J, Martin F Bachmann, Thomas M Kündig, Rolf M Zinkernagel, et Tak W Mak. 1993. « Peripheral T cells in mice lacking p56lck do not express significant antiviral effector functions. » *The journal of immunology* 151 (2): 699-706.

- Morgan, Doris Anne, et Francis W Ruscetti. 1976. « Selective in vitro Growth of T Lymphocytes from Normal Human Bone Marrows ». *Science* 193 (03): 1007-8.
- Motyka, Bruce, Gregory Korbitt, Michael J Pinkoski, Jeffrey A Heibin, Antonio Caputo, Marita Hobman, Michele Barry, et al. 2000. « Mannose 6-Phosphate / Insulin-like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B during Cytotoxic T Cell – Induced Apoptosis » 103: 491-500.
- Mu, Nele, Bernd Pichler, Thomas Wieder, Reinhard Mailhammer, Katrin Schaak, Kamran Ghoreschi, Amir Yazdi, et al. 2008. « Article TNFR1 Signaling and IFN- γ Signaling Determine whether T Cells Induce Tumor Dormancy or Promote Multistage Carcinogenesis », n^o June: 507-18. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.04.001>.
- Mueller, Daniel L, et Ronald H Schwartz. 1989. « CLONAL INACTIVATION : A Costimulatory Signalling Pathway Determines the Outcome of T Cell Antigen Receptor Occupancy ».
- Murre, Cornelis. 2009. « Developmental trajectories in early hematopoiesis ». *genes & development*, n^o 858: 2366-70. <https://doi.org/10.1101/gad.1861709.2366>.
- Myers, Darienne R., Julie Zikherman, et Jeroen P. Roose. 2017. « Tonic Signals: Why Do Lymphocytes Bother? » *Trends in Immunology* 38 (11): 844-57. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.06.010>.
- Nefedova, Yulia, Mei Huang, Sergei Kusmartsev, Raka Bhattacharya, Pingyan Cheng, Raoul Salup, Richard Jove, et Dmitry Gibrilovich. 2004. « Hyperactivation of STAT3 Is Involved in Abnormal Differentiation of Dendritic Cells in Cancer ». *The journal of immunology* 172 (1): 464-74.
- Nervi, S., C. Atlan-Gepner, B. Kahn-Perles, P. Lecine, B. Vialettes, J. Imbert, et P. Naquet. 2000. « Specific Deficiency of P56lck Expression in T Lymphocytes from Type 1 Diabetic Patients ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (10): 5874-83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.10.5874>.
- Nie, Hong, Yingxia Zheng, Runsheng Li, Taylor B Guo, Dongyi He, Lei Fang, Xuebin Liu, et al. 2013. « Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis ». *Nature Medicine* 19 (3). <https://doi.org/10.1038/nm.3085>.
- Nie, Lei, Min Xu, Antoaneta Vladimirova, et Xiao-hong Sun. 2003. « Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities » 22 (21).
- Nika, Konstantina, Cristiana Soldani, Mogjiborahman Salek, Wolfgang Paster, Adrian Gray, Ruth Etzensperger, Lars Fugger, et al. 2010. « Constitutively Active Lck Kinase in T Cells Drives Antigen Receptor Signal Transduction ». *Immunity* 32 (6): 766-77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.011>.
- Nika, Konstantina, Cristiana Soldani, Mogjiborahman Salek, Wolfgang Paster, Adrian Gray, Ruth Etzensperger, Antonella Viola, et al. 2010. « Article Constitutively Active Lck Kinase in T Cells Drives Antigen Receptor Signal Transduction ». <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.011>.
- Obeid, Michel, Antoine Tesniere, Gian Maria Fimia, Lionel Apetoh, Theoharis Panaretakis, Noelia Casares, Jean-luc Perfettini, et Maria Castedo. 2007. « Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death ». *Nature medicine* 13 (1): 54-61. <https://doi.org/10.1038/nm1523>.
- Oestreich, Kenneth J, Hyesuk Yoon, Rafi Ahmed, et Jeremy M Boss. 2008. « NFATc1 Regulates PD-1 Expression upon T Cell Activation ». *The journal of immunology* 181 (7): 4832-39.

- Oh, Ho S, Beom K Choi, Young H Kim, Don G Lee, Sunhee Hwang, et Myoung J Lee. 2015. « 4-1BB Signaling Enhances Primary and Secondary Population Expansion of CD8 + T Cells by Maximizing Autocrine IL-2 / IL-2 Receptor Signaling », 2-15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126765>.
- Opitz, Christiane A, Ulrike M Litzenburger, Felix Sahn, Martina Ott, Isabel Tritschler, Saskia Trump, Theresa Schumacher, et al. 2011. « An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor ». *Nature* 478 (5): 197-203.
<https://doi.org/10.1038/nature10491>.
- Osipovich, Oleg, Robin Milley Cobb, Kenneth J Oestreich, Steven Pierce, Pierre Ferrier, et Eugene M Oltz. 2007. « Essential function for SWI-SNF chromatin-remodeling complexes in the promoter-directed assembly of Tcrb genes » 8 (8): 809-16.
<https://doi.org/10.1038/ni1481>.
- Ouyang, Weiming, Will Liao, Chong T Luo, Na Yin, Morgan Huse, Myoungjoo V Kim, Min Peng, et al. 2012. « Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T reg cell function ». *Nature*, n° V. <https://doi.org/10.1038/nature11581>.
- Ouyang, Weiming, Soyoung A Oh, Qian Ma, Michael R Bivona, Jinfang Zhu, et Ming O Li. 2013. « TGF- β Cytokine Signaling Promotes CD8+T Cell Development and Low-Affinity CD4+ T Cell Homeostasis by Regulation of Interleukin-7 Receptor α Expression ». *Immunity* 39 (2): 335-46. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.016>.
- Ouyang, Xinshou, Ruihua Zhang, Jianjun Yang, Qingshan Li, Lihui Qin, Chen Zhu, Jianguo Liu, et al. 2011. « Transcription factor IRF8 directs a silencing programme for T H 17 cell differentiation ». *Nature Communications*, n° May.
<https://doi.org/10.1038/ncomms1311>.
- Ozmadencia, Duygu, Jayanth S. Shankara Narayananb, Jacob Andrewa, Marjaana Ojalilla, Allison M. Barriera, Shulin Jianga, Samhita Iyera, et al. 2022. « Tumor FAK orchestrates immunosuppression in ovarian cancer via the CD155 / TIGIT axis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119 (17): 1-11.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2117065119/-/DCSupplemental>. Published.
- Page, Martin J, Janette Bester, et Ethersia Pretorius. 2018. « The inflammatory effects of TNF- α and complement component 3 on coagulation ». *Scientific Reports*, n° January: 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20220-8>.
- Pao, Lily I, Karen Badour, Katherine A Siminovitch, et Benjamin G Neel. 2007. « Nonreceptor Phosphatases in Immune Cell Signaling ». *Annual review of immunology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115647>.
- Papageorgis, Panagiotis, Kuanghung Cheng, Sait Ozturk, Yi Gong, W Arthur, Hamid M Abdolmaleky, Jin-rong Zhou, et Sam Thiagalingam. 2011. « Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer ». *Cancer Research* 71 (3): 998-1008. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3269.Smad4>.
- Park, Benjamin V, Zachary T Freeman, Ali Ghasemzadeh, Michael A Chattergoon, Alleluiah Rutebemberwa, Jordana Steigner, Matthew E Winter, et al. 2016. « TGF- β 1-mediated Smad3 enhances PD-1 expression on antigen-specific T cells in cancer ». *Cancer Discovery* 6 (12): 1366-81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1347.TGF->.
- Park, Jung-hyun, Stanley Adoro, Terry Guintier, Batu Erman, Amala S Alag, Marta Catalfamo, Motoko Y Kimura, et al. 2010. « Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells ». *Nature Immunology* 11 (3): 257-65.
<https://doi.org/10.1038/ni.1840>.

- Peschon, By Jacques J, Philip J Morrissey, Kenneth H Grabstein, Fred J Ramsde, Eugene Maraskovsky, Brian C Gliniak, Linda S Park, et al. 1994. « Brief Detlntive » 180 (November): 6-11.
- Philipsen, Lars, Amarendra V Reddycherla, Roland Hartig, Janine Gumz, Matthias Kästle, Andreas Kritikos, Mateusz P Poltorak, et al. 2017. « De novo phosphorylation and conformational opening of the tyrosine kinase Lck act in concert to initiate T cell receptor signaling ». *Science signaling* 10: 1-14.
- Picca, Cristina Cozzo, Donald M Simons, Soyoungh Oh, Malinda Aitken, Olivia A Perng, Christina Mergenthaler, Elizabeth Kropf, Jan Erikson, et Andrew J Caton. 2011. « CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell formation requires more specific recognition of a self-peptide than thymocyte deletion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (36): 1-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103810108>.
- Pilotte, Luc, Pierre Larrieu, Vincent Stroobant, Didier Colau, Eduard Dolušic, Raphaël Frédérick, Etienne De Plaen, et al. 2012. « Reversal of tumoral immune resistance by inhibition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (7): 2497-2502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113873109>.
- Porritt, Helen E, Lynn L Rumpfelt, Sahba Tabrizifard, Thomas M Schmitt, Juan Carlos Zu, et Howard T Petrie. 2004. « Heterogeneity among DN1 Prothymocytes Reveals Multiple Progenitors with Different Capacities to Generate T Cell and Non-T Cell Lineages ». *Immunity* 20: 735-45.
- Purtic, Bozidar, Lisa A. Pitcher, Nicolai S. C. van Oers, et Christoph Wülfing. 2005. « T Cell Receptor (TCR) Clustering in the Immunological Synapse Integrates TCR and Costimulatory Signaling in Selected T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (8): 2904-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406867102>.
- Qiao, Yuan, Xin Huang, Sridhar Nimmagadda, Renyuan Bai, Catherine A Foss, Ian Cheong, Matthias Holdhoff, et al. 2011. « A Robust Approach to Enhance Tumor-selective Accumulation of Nanoparticles ». *Oncotarget* 2 (1): 59-68.
- Qin, Yan, Brian S Garrison, Wenjiang Ma, Derrick J Rossi, Chafen Lu, Timothy A Springer, Yan Qin, et al. 2018. « Article A Milieu Molecule for TGF- b Required for Microglia Function in the Nervous System Article A Milieu Molecule for TGF- b Required for Microglia Function in the Nervous System ». *Cell* 174 (1): 156-171.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.027>.
- Qureshi, Omar S, Yong Zheng, Kyoko Nakamura, Kesley Attridge, Claire Manzotti, Emily M Schmidt, Jennifer Baker, et al. 2011. « Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4 ». *Science* 332 (4): 600-603. <https://doi.org/10.1126/science.1202947>.
- Rabinovich, Gabriel A., Dmitry Gabrilovich, et Eduardo M. Sotomayor. 2007. « Immunosuppressive Strategies That Are Mediated by Tumor Cells ». *Annual Review of Immunology* 25: 267-96. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609>.
- Redjimi, Nassima, Caroline Raf, Isabelle Raimbaud, Pascale Pignon, Junko Matsuzaki, Kunle Odunsi, Danila Valmori, et Maha Ayyoub. 2012. « CXCR3+ T Regulatory Cells Selectively Accumulate in Human Ovarian Carcinomas to Limit Type I Immunity ». *Cancer Research* 72 (17): 4351-60. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0579>.
- Ribeiro, Solange M F, Maria Poczatek, Stacey Schultz-cherry, Matteo Villain, et Joanne E Murphy-ullrich. 1999. « The Activation Sequence of Thrombospondin-1 Interacts with the Latency-associated Peptide to Regulate Activation of Latent Transforming Growth

- Factor- β ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (19): 13586-93.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13586>.
- Riquelme, Erick, Leandro J. Carreño, Pablo A. González, et Alexis M. Kalergis. 2009. « The Duration of TCR/PMHC Interactions Regulates CTL Effector Function and Tumor-Killing Capacity ». *European Journal of Immunology* 39 (8): 2259-69.
<https://doi.org/10.1002/eji.200939341>.
- Robertson, Ian B, et Daniel B Rifkin. 2016. « Regulation of the Bioavailability of TGF- β and TGF- β -Related Proteins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1-25.
- Rock, K L. 1995. « A Phagosome-to-Cytosol Pathway for Exogenous Antigens Presented on MHC Class I Molecules ». *Science* 267 (January): 243-46.
- Ronchetti, Simona, Giuseppe Nocentini, Rodolfo Bianchini, L Tibor Krausz, Graziella Migliorati, et Carlo Riccardi. 2007. « Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein Lowers the Threshold of CD28 Costimulation in CD8⁺ T Cells ». *The Journal of immunology* 179 (9): 5916-26.
- Ronchetti, Simona, Ornella Zollo, Stefano Bruscoli, Massimiliano Agostini, Giuseppe Nocentini, Emira Ayroldi, et Carlo Riccardi. 2004. « Frontline : GITR , a member of the TNF receptor superfamily , is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations », 613-22. <https://doi.org/10.1002/eji.200324804>.
- Rossy, Jérémie, Dylan M Owen, David J Williamson, Zhengmin Yang, et Katharina Gaus. 2013. « Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling ». *Nature Immunology* 14 (1): 82-90. <https://doi.org/10.1038/ni.2488>.
- Rudd, Christopher E, et Christopher E Rudd. 2009. « CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction » 229: 12-26.
- Russell, John H, et Timothy J Ley. 2002. « LYMPHOCYTE-MEDIATED CYTOTOXICITY ». *Annual review of immunology* 20 (6): 323-70.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730>.
- Sabry, C Marcela Díaz-montero, El Naggar, Amir Al, Khami Randa, El Naggar, Alberto J Montero, David J Cole, et Mohamed L Salem. 2008. « Priming of naive CD8 + T cells in the presence of IL-12 selectively enhances the survival of CD8 + CD62L hi cells and results in superior anti-tumor activity in a tolerogenic murine model ». *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 563-72. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0394-0>.
- Salerno, Elise P, Davide Bedognetti, Ileana S Mauldin, Donna H Deacon, Sofia M Shea, Joel Pinczewski, Joseph M Obeid, et al. 2016. « Human melanomas and ovarian cancers overexpressing mechanical barrier molecule genes lack immune signatures and have increased patient mortality risk ». <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1240857>.
- Salmaninejad, Arash. 2019. « PD - 1 / PD - L1 pathway : Basic biology and role in cancer immunotherapy » 2 (January): 16824-37. <https://doi.org/10.1002/jcp.28358>.
- Salomon, Benoit, Deborah J Lenschow, Lesley Rhee, Neda Ashourian, Bhagarith Singh, Arlene Sharpe, et Jeffrey A Bluestone. 2000. « B7 / CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes » 12: 431-40.
- Sanford, L Philip, Ilona Ormsby, Adriana C Gittenberger-de Groot, Hannu Sariola, Rick Friedman, Gregory P Boivin, Emma Lou Cardell, et Thomas Doetschman. 1997. « TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non- overlapping with other TGF β knockout phenotypes » 2670: 2659-70.
- Sanjabi, Shomyseh, Soyoung A Oh, et Ming O Li. 2017. « Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection », 1-33.

- Sauer, Heinrich, Jiirg Tschopp, et Sucharit Bhakdi. 1991. « Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1063: 137-46.
- Schildberg, Frank A, Sarah R Klein, Gordon J Freeman, et Arlene H Sharpe. 2016. « Review Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family ». *Immunity* 44 (5): 955-72. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.002>.
- Schmedt, C., et A. Tarakhovskiy. 2001. « Autonomous Maturation of Alpha/Beta T Lineage Cells in the Absence of COOH-Terminal Src Kinase (Csk) ». *The Journal of Experimental Medicine* 193 (7): 815-26. <https://doi.org/10.1084/jem.193.7.815>.
- Schmitt, Erica G., Dipica Haribhai, Jason B. Williams, Praful Aggarwal, Shuang Jia, Louis-Marie Charbonnier, Ke Yan, et al. 2012. « IL-10 Produced by Induced Regulatory T Cells (iTregs) Controls Colitis and Pathogenic Ex-iTregs during Immunotherapy ». *The journal of immunology* 189 (12): 5368-5648. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200936>.
- Schmitt, Thomas M, Maria Ciofani, Howard T Petrie, et Juan Carlos Zúñiga-pflücker. 2004. « Maintenance of T Cell Specification and Differentiation Requires Recurrent Notch Receptor – Ligand Interactions » 200 (4). <https://doi.org/10.1084/jem.20040394>.
- Sethi, Gautam, Bokyoung Sung, et Bharat B. Aggarwal. 2008. « TNF: A master switch for inflammation to cancer ». *Frontiers in bioscience*, n° 5: 5094-5107.
- Sheppard, Kelly-ann, Lori J Fitz, Julie M Lee, Christina Benander, Judith A George, Joe Wooters, Yongchang Qiu, et al. 2004. « PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70 / CD3 f signalosome and downstream signaling to PKC h » 574: 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.083>.
- Shi, Weibin, Chuanxi Sun, Bin He, Wencheng Xiong, Xingming Shi, Dachun Yao, et Xu Cao. 2004. « GADD34–PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFb type I receptor ». *The Journal of Cell Biology* 164 (2): 291-300. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307151>.
- Shi, Yigong, et Joan Massague. 2003. « Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus ». *Cell* 113: 685-700.
- Shuford, By Walter W, Kerry Klussman, Douglas D Tritchler, Deryk T Loo, Jan Chalupny, Anthony W Siadak, T Joseph Brown, et al. 1997. « 4-1BB Costimulatory Signals Preferentially Induce CD8 α T Cell Proliferation and Lead to the Amplification In Vivo of Cytotoxic T Cell Responses » 186 (1).
- Shull, Marcia M, Ilona Ormsby, Ann B Kiert, Sharon Pawlowski, Ronald J Diebold, Moying Yin, Ruth Allen, et al. 1992. « Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease ». *Nature* 359 (10): 693-99.
- Smads, Inhibitory, Keiji Miyazawa, et Kohei Miyazono. 2017. « Regulation of TGF- β Family Signaling ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1-25.
- Smith, Kendall A. 1988. « Interleukin-2: Inception, Inception, Impact, and Implications ». *Science* 240 (5): 1169-76.
- Smyth, L. A., O. Williams, R. D. Huby, T. Norton, O. Acuto, S. C. Ley, et D. Kioussis. 1998. « Altered Peptide Ligands Induce Quantitatively but Not Qualitatively Different Intracellular Signals in Primary Thymocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (14): 8193-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8193>.
- Song, Mengjia, Yu Ping, Kai Zhang, Li Yang, Feng Li, Chaoqi Zhang, Shaoyan Cheng, et al. 2019. « Low-Dose IFN γ Induces Tumor Cell Stemness in Tumor Microenvironment of

- Non – Small Cell Lung Cancer ». *Cancer Research* 79(14) (7): 3737-48.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0596>.
- Sridaran, Dhivya, Surbhi Chouhan, Kiran Mahajan, Arun Renganathan, Cody Weimholt, Shambhavi Bhagwat, Melissa Reimers, et al. 2022. « Inhibiting ACK1-mediated phosphorylation of C-terminal Src kinase counteracts prostate cancer immune checkpoint blockade resistance ». *Nature Communications* 13: 1-21.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34724-5>.
- Stamper, Carin C, Yan Zhang, Tobin James F, Erbe David V, Shinji Ikemizu, Simon J Davis, Mark.L Stahl, Jasbir Sehra, William S Somers, et Lidia Mosyak. 2001. « Crystal structure of the B7-1 / CTLA-4 complex that inhibits human immune responses ». *Nature* 410 (March): 608-11.
- Starbeck-miller, Gabriel R, Hai-hui Xue, et John T Harty. 2014. « IL-12 and type I interferon prolong the division of activated CD8 T cells by maintaining high-affinity IL-2 signaling in vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 211 (1): 105-20.
<https://doi.org/10.1084/jem.20130901>.
- Staron, Matthew M, Simon M Gray, Heather D Marshall, Ian A Parish, Jonathan H Chen, Curtis J Perry, Guoliang Cui, Ming O Li, et Susan M Kaech. 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): 802-14.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.013>.
- Steen, Sharri Bockheim, Larissa Gomelsky, et David B Roth. 1996. « The 12 / 23 rule is enforced at the cleavage step of V (D) J recombination in vivo », n° D: 543-53.
- Stein, Paul L, Hon-man Lee, Susan Rich, et Philippe Soriano. 1992. « pp59fyn Mutant Mice Display Differential Signaling in Thymocytes and Peripheral T Cells ». *Cell* 70: 741-50.
- Stephen, Tom L, Melanie R Rutkowski, Michael J Allegranza, Alfredo Perales-puchalt, Amelia J Tesone, Nikolaos Svoronos, Jenny M Nguyen, Fahmida Sarmin, Mark E Borowsky, et Julia Tchou. 2014. « Transforming Growth Factor b -Mediated Suppression of Antitumor T Cells Requires FoxP1 Transcription Factor Expression ». *Immunity*, 427-39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.012>.
- Stephens, Geoffrey L, Rebecca S Mchugh, Matthew J Whitters, Deborah A Young, Deborah Luxenberg, Beatriz M Carreno, Mary Collins, et Ethan M Shevach. 2004. « Engagement of Glucocorticoid-Induced TNFR Family-Related Receptor on E ector T Cells by its Ligand Mediates Resistance to Suppression by CD4 + CD25 + T Cells ». *The journal of immunology* 173 (8): 5008-20.
- Stinchcombe, Jane C, et Gillian M Griffiths. 2007. « Secretory Mechanisms in Cell-Mediated Cytotoxicity ». *Annual review of cell and developmental biology* 2007 (23): 495-517.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123521>.
- Stockis, Julie, Didier Colau, Pierre G Coulie, et Sophie Lucas. 2009. « Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF- b on the surface of activated human Treg ». *European Journal of Immunology*, 3315-22. <https://doi.org/10.1002/eji.200939684>.
- Strasser, Andreas, Philipp J Jost, et Shigekazu Nagata. 2009. « Review The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System ». *Immunity* 30 (2): 180-92.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.001>.
- Streel, Grégoire De, Charlotte Bertrand, Nicolas Chalon, Stéphanie Liénart, Orian Bricard, Sara Lecomte, Julien Devreux, et al. 2020. « Selective inhibition of TGF-β1 produced by GARP-expressing Tregs overcomes resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer ». *Nature Communications*, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17811-3>.

- Su, Yu-wen, Yong Zhang, Jutta Schweikert, Gary A Koretzky, Michael Reth, et Jürgen Wienands. 1999. « Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases ». *European Journal of Immunology*, 3702-11.
- Sugimoto, Kotaro, Xiaozhu Huang, Dean Sheppard, Kotaro Sugimoto, Makoto Kudo, Aparna Sundaram, Xin Ren, et al. 2012. « The $\alpha v \beta 6$ integrin modulates airway hyperresponsiveness in mice by regulating intraepithelial mast cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (2): 748-58. <https://doi.org/10.1172/JCI58815.748>.
- Sun, Jiaren, Daniel J Leahy, et Paula B Kavathas. 1995. « Interaction Between CD8 and Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Mediated by Multiple Contact Surfaces that Include the $\alpha 2$ and $\alpha 3$ Domains of MHC Class I ». *The Journal of Experimental Medicine* 182 (November).
- Sutton, Vivien R, Michelle E Wowk, Michael Cancilla, et Joseph A Trapani. 2003. « Caspase Activation by Granzyme B Is Indirect , and Caspase Autoprocessing Requires the Release of Proapoptotic Mitochondrial Factors ». *Immunity* 18: 319-29.
- Taghon, Tom N, Elizabeth-sharon David, Juan Carlos Zúñiga-pflücker, et Ellen V Rothenberg. 2005. « Delayed , asynchronous , and reversible T-lineage specification induced by Notch / Delta signaling » 5: 965-78. <https://doi.org/10.1101/gad.1298305.precursors>.
- Tai, Xuguang, Michelle Cowan, Lionel Feigenbaum, et Alfred Singer. 2005. « CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2 » 6 (2): 152-62. <https://doi.org/10.1038/ni1160>.
- Tanaka, Atsushi, et Shimon Sakaguchi. 2017. « Regulatory T cells in cancer immunotherapy ». *Nature Publishing Group*, 109-18. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>.
- Tauriello, Daniele V. F., Sergio Palomo-Ponce, Diana Stork, Antonio Berenguer-Llergo, Jordi Badia-Ramentol, Mar Iglesias, Marta Sevillano, et al. 2018. « TGF β Drives Immune Evasion in Genetically Reconstituted Colon Cancer Metastasis ». *Nature* 554 (7693): 538-43. <https://doi.org/10.1038/nature25492>.
- Taylor, Brandie C, et Justin M Balko. 2022. « Mechanisms of MHC-I Downregulation and Role in Immunotherapy Response » 13 (February): 1-11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.844866>.
- Teicher, Beverly A. 2007. « Transforming Growth Factor- β and the Immune Response to Malignant Disease ». *Clinical Cancer Research* 13 (21): 6247-51. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1654>.
- Thomas, Dori A, et Joan Massagué. 2005a. « TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance » 8 (November): 369-80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>.
- Thomas, Dori A., et Joan Massagué. 2005b. « TGF- β Directly Targets Cytotoxic T Cell Functions during Tumor Evasion of Immune Surveillance ». *Cancer Cell* 8 (5): 369-80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>.
- Tolcher, Anthony W., Jordan D. Berlin, Jan Cosaert, John Kauh, Emily Chan, Sarina A. Piha-Paul, Alex Amaya, et al. 2017. « A Phase 1 Study of Anti-TGF β Receptor Type-II Monoclonal Antibody LY3022859 in Patients with Advanced Solid Tumors ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 79 (4): 673-80. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3245-5>.
- Toriyama, Koji, Makoto Kuwahara, Hiroshi Kondoh, Takumi Mikawa, Nobuaki Takemori, Amane Konishi, Toshihiro Yorozuya, et al. 2020. « T cell-specific deletion of Pgam1

- reveals a critical role for glycolysis in T cell responses ». *Communications Biology* 394 (3): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01122-w>.
- Torre-amione, Guillermo, R Daniel Beauchamp, Hartmut Koeppen, B E N H Park, Hans Schreiber, Harold L Mosest, et Donald A Rowley. 1990. « A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type b1 cDNA escapes immune surveillance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (February): 1486-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1486>.
- Tran, Dat Q, John Andersson, Rui Wang, Heather Ramsey, Derya Unutmaz, et Ethan M Shevach. 2009. « GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- β on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (32): 13445-50.
- Trapani, Joseph A, et Mark J Smyth. 2002. « FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF THE PERFORIN / GRANZYME CELL DEATH PATHWAY ». *Nature Reviews Immunology* 2 (October). <https://doi.org/10.1038/nri911>.
- Trapani, Joseph A, Vivien R Sutton, Kevin Y T Thia, Yu Qin Li, Christopher J Froelich, David A Jans, Mauro S Sandrin, et Kylie A Browne. 2003. « A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death ». *The Journal of Cell Biology* 160 (01): 223-33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210150>.
- Travis, Mark A, Boris Reizis, Andrew C Melton, Emma Masteller, Qizhi Tang, John M Proctor, Yanli Wang, et al. 2007. « Loss of integrin α v β 8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice » 449 (September): 361-66. <https://doi.org/10.1038/nature06110>.
- Travis, Mark A, et Dean Sheppard. 2014a. « TGF- β Activation and Function in Immunity ». *Annual review of immunology*, n° November 2013: 51-82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>.
- Travis, Mark A., et Dean Sheppard. 2014b. « TGF- β Activation and Function in Immunity ». *Annual Review of Immunology* 32 (1): 51-82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>.
- Trinchieri, Giorgio, Stefan Pflanz, et Robert A Kastelein. 2003. « The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines : New Players in the Regulation of T Cell Responses » 19: 641-44.
- Tu, Eric, Cheryl P. Z. Chia, Weiwei Chen, Dunfang Zhang, Sang A. Park, Wenwen Jin, Dandan Wang, et al. 2018. « T Cell Receptor-Regulated TGF- β Type I Receptor Expression Determines T Cell Quiescence and Activation ». *Immunity* 48 (4): 745-759.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.025>.
- Tuosto, Loretta, et Oreste Acuto. 1998. « CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement », 2131-42.
- Uckun, Fatih M., Sanjive Qazi, Larn Hwang, et Vuong N. Trieu. 2019. « Recurrent or Refractory High-Grade Gliomas Treated by Convection-Enhanced Delivery of a TGF β 2-Targeting RNA Therapeutic: A Post-Hoc Analysis with Long-Term Follow-Up ». *Cancers* 11 (12): 1892. <https://doi.org/10.3390/cancers11121892>.
- Valencia, Xavier, Geoffrey Stephens, Raphaela Goldbach-mansky, Mildred Wilson, Ethan M Shevach, et Peter E Lipsky. 2006. « TNF downmodulates the function of human CD4+CD25 hi T-regulatory cells ». *Blood* 108 (1): 253-61. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4567>.Supported.

- Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, et J. B. Bolen. 1988. « The CD4 and CD8 T Cell Surface Antigens Are Associated with the Internal Membrane Tyrosine-Protein Kinase P56lck ». *Cell* 55 (2): 301-8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90053-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90053-0).
- Velasco-Loyden, Gabriela, Joaquín Arribas, et Fernando López-Casillas. 2004. « The Shedding of Betaglycan Is Regulated by Pervanadate and Mediated by Membrane Type Matrix Metalloprotease-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (9): 7721-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306499200>.
- Veldhoen, Marc, Richard J Hocking, Christopher J Atkins, Richard M Locksley, Brigitta Stockinger, et Mill Hill. 2006. « TGF b in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells », n° February: 179-89. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.001>.
- Vermorken, J.B., F. Peyrade, J. Krauss, R. Mesía, E. Remenar, T.C. Gauler, U. Keilholz, et al. 2014. « Cisplatin, 5-Fluorouracil, and Cetuximab (PFE) with or without Cilengitide in Recurrent/Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Results of the Randomized Phase I/II ADVANTAGE Trial (Phase II Part) ». *Annals of Oncology* 25 (3): 682-88. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu003>.
- Vince, James E, Diep Chau, Bernard Callus, W Wei-lynn Wong, Christine J Hawkins, Pascal Schneider, Mark Mckinlay, et al. 2008. « TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1 – TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFa ». *The Journal of Cell Biology* 182 (1): 171-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801010>.
- Vredevoogd, David W., Thomas Kuilman, Maarten A. Ligtenberg, Julia Boshuizen, Kelly E. Stecker, Beaunelle de Bruijn, Oscar Krijgsman, et al. 2019. « Augmenting Immunotherapy Impact by Lowering Article Augmenting Immunotherapy Impact by Lowering Tumor TNF Cytotoxicity Threshold ». *Cell* 178 (3): 585-599.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.014>.
- Wahl, Sharon M., Jie Wen, et Niki Moutsopoulos. 2006. « TGF-β: A Mobile Purveyor of Immune Privilege ». *Immunological Reviews* 213 (1): 213-27. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00437.x>.
- Wakefield, L M, A D Levinson, M B Sporn, Arthur D Levinson, et Michael B Sporn. 1990. « Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1 , and a different tissue distribution . Recombinant Latent Transforming Growth Factor , 1 Has a Longer Plasma Half-Lif ». *The Journal of Clinical Investigation* 86 (6): 1976-84.
- Walker, Lucy S K, et David M Sansom. 2011. « The emerging role of CTLA4 as a cell- extrinsic regulator of T cell responses ». *Nature Reviews Immunology* 11 (December). <https://doi.org/10.1038/nri3108>.
- Wan, Mei, Xuesong Cao, Yalei Wu, Shuting Bai, Liyu Wu, Xingming Shi, et Ning Wang. 2002. « Jab1 antagonizes TGF- β signaling by inducing Smad4 degradation » 3 (2): 171-76.
- Wan, Mei, Yi Tang, Ewan M Tytler, Chongyuan Lu, Bingwen Jin, Selwyn M Vickers, Lei Yang, Xingming Shi, et Xu Cao. 2004. « Smad4 Protein Stability Is Regulated by Ubiquitin ligase SCFb-TrCP1 ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (15): 14484-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400005200>.
- Wang, Bruce, Brian M Dolinski, Noriko Kikuchi, Diane R Leone, Marion G Peters, Paul H Weinreb, Shelia M Violette, et D Montgomery Bissell. 2007. « Role of avb6 Integrin in Acute Biliary Fibrosis ». *hepatology* 46 (5): 1404-12. <https://doi.org/10.1002/hep.21849>.

- Wang, Rui, Jianghai Zhu, Xianchi Dong, Minlong Shi, Chafen Lu, et Timothy A Springer. 2012. « GARP regulates the bioavailability and activation of TGF β » 23: 1129-39. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1018>.
- Waterhouse, Nigel J, Karin A Sedelies, Kylie A Browne, Michelle E Wowk, Andrea Newbold, Vivien R Sutton, Chris J P Clarke, et al. 2005. « A Central Role for Bid in Granzyme B-induced Apoptosis * ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 4476-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410985200>.
- Wendt, Michael K., et William P. Schiemann. 2009. « Therapeutic Targeting of the Focal Adhesion Complex Prevents Oncogenic TGF-Beta Signaling and Metastasis ». *Breast Cancer Research: BCR* 11 (5): R68. <https://doi.org/10.1186/bcr2360>.
- Wilcox, Ryan A., Andrei I. Chapoval, Kevin S. Gorski, Mizuto Otsuji, Tahiro Shin, Dallas B. Flies, Koji Tamada, et al. 2002. « Cutting Edge: Expression of Functional CD137 Receptor by Dendritic Cells ». *The journal of immunology* 168 (9): 4262-67.
- Wilson, Anne, H Robson Macdonald, et Freddy Radtke. 2001. « Notch 1 – deficient Common Lymphoid Precursors Adopt a B Cell Fate in the Thymus » 194 (7).
- Wojtowicz-praga, Slawomir. 2003. « Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF-inhibitors », 21-32.
- Won, Jonghwa, Hongtae Kim, Eun Jeong Park, Yeonchul Hong, Seong-jin Kim, et Yungdae Yun. 1999. « Tumorigenicity of Mouse Thymoma Is Suppressed by Soluble Type II Transforming Growth Factor b Receptor Therapy 1 », 1273-77.
- Worthington, John J, Beata I Czajkowska, Andrew C Melton, et Mark A Travis. 2011. « Intestinal Dendritic Cells Specialize to Activate Transforming Growth Factor- β and Induce Foxp3+ Regulatory T Cells via Integrin α v β 8 ». *Gastroenterology* 141 (5): 1802-12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.057>.
- Worthington, John J, Aoife Kelly, Catherine Smedley, David Bauché, Simon Campbell, Julien C Marie, et Mark A Travis. 2015a. « Integrin α v β 8-Mediated TGF- β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation ». *Immunity* 42: 903-15. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.012>.
- Worthington, John J., Aoife Kelly, Catherine Smedley, David Bauché, Simon Campbell, Julien C. Marie, et Mark A. Travis. 2015b. « Integrin α v β 8-Mediated TGF- β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation ». *Immunity* 42 (5): 903-15. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.012>.
- Würfel, Franziska M, Christoph Winterhalter, Peter Trenkwalder, Ralph M Wirtz, et Wolfgang Würfel. 2019. « European Patent in Immunoncology : From Immunological Principles of Implantation to Cancer Treatment ».
- Xia, Lijun, Markus Sperandio, Tadayuki Yago, J Michael Mcdaniel, Richard D Cummings, Sonia Pearson-white, Klaus Ley, et Rodger P Mcever. 2002. « P-selectin glycoprotein ligand-1 – deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow » 109 (7): 939-50. <https://doi.org/10.1172/JCI200214151>.Introduction.
- Xiao, Zhengguo, Kerry A Casey, Stephen C Jameson, Julie M Curtsinger, et F Matthew. 2009. « Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or Type I IFN ». *The journal of immunology* 182 (5): 2786-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803484>.Programming.

- Yamaguchi, H., et W. A. Hendrickson. 1996. « Structural Basis for Activation of Human Lymphocyte Kinase Lck upon Tyrosine Phosphorylation ». *Nature* 384 (6608): 484-89. <https://doi.org/10.1038/384484a0>.
- Yamaguchi, Hiroto, et Wayne A Hendrickson. 1996. « Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation ». *Nature* 384 (December): 484-89.
- Yamasaki, Sho, Eri Ishikawa, Machie Sakuma, Koji Ogata, Kumiko Sakata-sogawa, Michio Hiroshima, David L Wiest, Makio Tokunaga, et Takashi Saito. 2006. « Mechanistic basis of pre – T cell receptor – mediated autonomous signaling critical for thymocyte development » 7 (1): 67-75. <https://doi.org/10.1038/ni1290>.
- Yang, Xiao, John J Letterio, Robert J Lechleider, Lin Chen, Russ Hayman, Hua Gu, Anita B Roberts, et Chuxia Deng. 1999. « Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β ». *The EMBO Journal* 18 (5): 1280-91.
- Yano, Masashi, Noriyuki Kuroda, Hongwei Han, Makiko Meguro-horike, Yumiko Nishikawa, Hiroshi Kiyonari, Kentaro Maemura, et al. 2008. « Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance » 205 (12): 2827-38. <https://doi.org/10.1084/jem.20080046>.
- Yeung, Vincent, Srinivas Sriram, Jennifer A. Tran, Xiaoqing Guo, Audrey E. K. Hutcheon, James D. Zieske, Dimitrios Karamichos, et Joseph B. Ciolino. 2021. « FAK Inhibition Attenuates Corneal Fibroblast Differentiation In Vitro ». *Biomolecules* 11 (11): 1682. <https://doi.org/10.3390/biom11111682>.
- Yoshida, Yuko, Ryusuke Yoshimi, Hiroaki Yoshii, Daniel Kim, Anup Dey, Huabao Xiong, Jeeva Munasinghe, et al. 2014. « Article The Transcription Factor IRF8 Activates Integrin-Mediated TGF- β Signaling and Promotes Neuroinflammation ». *Immunity* 40 (2): 187-98. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.022>.
- Young, A. C., W. Zhang, J. C. Sacchettini, et S. G. Nathenson. 1994. « The Three-Dimensional Structure of H-2Db at 2.4 Å Resolution: Implications for Antigen-Determinant Selection ». *Cell* 76 (1): 39-50. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90171-6).
- Young, Ding-e, Chau-ching Liu, Lauren G Leong, et Zanvil A Cohn. 1986. « THE PORE-FORMING PROTEIN (PERFORIN) OF CYTOLYTIC T LYMPHOCYTES IS IMMUNOLOGICALLY RELATED TO THE COMPONENTS OF MEMBRANE ATTACK COMPLEX OF COMPLEMENT THROUGH CYSTEINE-RICH DOMAINS ». *The Journal of Experimental Medicine* 164 (December): 2077-82.
- Yu, Aixin, Isaac Snowwhite, Francesco Vendrame, Michelle Rosenzweig, David Klatzmann, Alberto Pugliese, et Thomas R. Malek. 2015. « Selective IL-2 Responsiveness of Regulatory T Cells Through Multiple Intrinsic Mechanisms Supports the Use of Low-Dose IL-2 Therapy in Type 1 Diabetes ». *Diabetes* 64 (6): 2172-83. <https://doi.org/10.2337/db14-1322>.
- Yu, L. 2002. « TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses ». *The EMBO Journal* 21 (14): 3749-59. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf366>.
- Zhang, Nu, et Michael J Bevan. 2012. « TGF- β signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation ». *Nature Immunology* 13 (7): 667-74. <https://doi.org/10.1038/ni.2319>.
- Zhang, Ying, Chenbei Chang, Daniel J Gehling, Ali Hemmati-brivanlou, et Rik Derynck. 2001. « Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2 , an E3 ubiquitin ligase ».

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (3): 2-7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.974>.
- Zhang, Ying E. 2009. « Non-Smad pathways in TGF- β signaling » 19 (1): 128-39.
<https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>.
- Zhu, Jiangwen, Karin Motejlek, Denan Wang, Keling Zang, Andrea Schmidt, et Louis F Reichardt. 2002. « β 8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos ». *Development* 2903: 2891-2903.
- Zhu, Jingjing, Céline G Powis De Tenbossche, Stefania Cané, Didier Colau, Nicolas Van Baren, Christophe Lurquin, Peter Liljeström, Catherine Uyttenhove, et Benoit J Van Den Eynde. 2017. « Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes ». *Nature Communications*, 1-15.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00784-1>.
- Zhu, Xiao-mei, Yong-ming Yao, Hua-ping Liang, Shan Xu, Ning Dong, Yan Yu, et Zhi-yong Sheng. 2009. « The Effect of High Mobility Group Box-1 Protein on Splenic Dendritic Cell Maturation in Rats ». *Journal of interferon and cytokine research* 29 (10): 677-86.
<https://doi.org/10.1089/jir.2008.0104>.
- Zlotoff, Daniel A, Arivazhagan Sambandam, Theodore D Logan, J Jeremiah Bell, Benjamin A Schwarz, et Avinash Bhandoola. 2010. « CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus ». *Blood* 115 (10): 1897-1905.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237784>.The.
- Zong, Jinbao, Anton A Keskinov, Galina V Shurin, et Michael R Shurin. 2016. « Tumor - derived factors modulating dendritic cell function ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 65 (7): 821-33. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1820-y>.
- Zou, Weiping, et Lieping Chen. 2008. « Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment ». *Nature Reviews Immunology* 8 (june).
<https://doi.org/10.1038/nri2326>.