



HAL
open science

Etude du micro environnement immunitaire dans le lymphome T : caractérisation et ciblage thérapeutique

Pierre Stephan

► **To cite this version:**

Pierre Stephan. Etude du micro environnement immunitaire dans le lymphome T : caractérisation et ciblage thérapeutique. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10240 . tel-04807012

HAL Id: tel-04807012

<https://theses.hal.science/tel-04807012v1>

Submitted on 27 Nov 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.

Université Claude Bernard  Lyon 1

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

**Ecole Doctorale N° 340
Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative
et Cellulaire (BMIC)**

Discipline : Onco-Immunologie

Soutenue publiquement le 24/11/2023, par :
Pierre STEPHAN

**Etude du micro environnement
immunitaire dans le lymphome T :
caractérisation
et ciblage thérapeutique**

Devant le jury composé de :

SUJOBERT, Pierre	PU/PH	Université Lyon 1	Président
THIEBLEMONT, Catherine	PU/PH	Université Paris Cité	Rapporteur
COHEN, José	PU/PH	Université Paris-Est	Rapporteur
DE LEVAL, Laurence	PU/PH	Université de Lausanne	Examinatrice
AYYOUB, Maha	PU/PH	Université Toulouse III	Examinatrice
GRINBERG-BLEYER, Yenkel	Chargé de recherche INSERM		Directeur de thèse

Résumé en français

Les lymphomes T périphériques (PTCL) de type angio-immunoblastiques (AITL) ou avec un profil de lymphocyte T folliculaire helper (TFH) et sans autre spécificité (NOS), sont des hémopathies malignes de mauvais pronostic, pour lesquels les traitements existants ne sont que partiellement efficaces. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires.

Dans de nombreux cancers, la progression tumorale est indexée sur la qualité des réponses immunitaires. La description du micro-environnement tumoral et l'élucidation des mécanismes moléculaires permettant l'échappement des tumeurs au système immunitaire, ont conduit au développement des immunothérapies qui ont révolutionné la prise en charge de certains cancers. Parmi celles-ci, les thérapies de types inhibiteurs de checkpoint, permettent de revigorer la fonction des lymphocytes T (LT). Néanmoins, la composition du système immunitaire dans les PTCL est encore mal comprise, et les patients ne bénéficient pas encore des immunothérapies. Dans ce travail, nous avons cherché à documenter la distribution et le phénotype des cellules immunitaires dans les ganglions de patients atteints d'AITL et de PTCL NOS. Pour ce faire, nous avons mis au point une méthodologie innovante basée sur l'utilisation de la cytométrie en flux spectrale.

Nous avons pu mettre en évidence un déséquilibre immunitaire dans les échantillons de PTCL en comparaison de tissus lymphoïdes non tumoraux. Une expansion des LT, cellules Natural Killer et cellules dendritiques, au dépend des lymphocytes B, a pu être détectée. Néanmoins, la majorité des LT CD8⁺, présentaient un phénotype épuisé, suggérant une altération de leur fonction anti-tumorale. Cette observation, combinée à une forte expansion des LT régulateurs FOXP3⁺ (Treg), suggère que le microenvironnement des PTCL est sujet à une immunosuppression soutenant la progression tumorale, et serait donc un candidat adéquat aux immunothérapies. En ce sens, nous avons pu mettre en évidence une expression de CTLA-4, ICOS ou OX-40, restreinte aux cellules tumorales et aux Treg, constituant ainsi des cibles thérapeutiques potentielles. D'autre part, nous avons détecté une augmentation généralisée de l'expression de l'ecto-enzyme immunosuppressive CD39, dans les tissus de patients PTCL. Une analyse rétrospective par multi-immunofluorescence, a permis d'associer une expression élevée de CD39 par les lymphocytes T et un mauvais pronostic pour les patients.

Nos travaux mettent en évidence une altération de la réponse immunitaire dans le microenvironnement des PTCL de type AITL et PTCL, NOS, ainsi que des cibles thérapeutiques et un bio-marqueur pronostic potentiel. De plus, nos données supportent l'utilisation de la cytométrie spectrale pour l'étude de la réponse immunitaire dans les hémopathies malignes. En ce sens, nous avons également validé son utilisation dans la leucémie lymphoïde chronique de type B, chez des patients traités par Ibrutinib en statut de réponse ou de rechute ; dans ce cadre il apparaît que le statut de réponse n'altère pas en profondeur le phénotype des LT.

Mots clés : Lymphome T, microenvironnement immunitaire, immunothérapie, cytométrie spectrale

Summary in english

Peripheral T-cell lymphoma (PTCL) such as angioimmunoblastic lymphoma (AITL) or with a follicular helper T lymphocyte (TFH) profile and no other specificity (NOS) are hematologic malignancies with a poor prognosis, for which existing treatments are only partially effective. New therapeutic strategies are therefore necessary.

In many cancers, tumor progression is indexed to the quality of immune responses. The description of the tumor microenvironment and the elucidation of molecular mechanisms enabling tumor escape from the immune system, have led to the development of immunotherapies that have revolutionized the treatment of some cancers. Among these, checkpoint inhibitors reinvigorate the function of T lymphocytes. However, the composition of the immune system in PTCL is still ill described, and patients do not yet benefit from immunotherapies. In this work, we aimed to document the distribution and phenotype of immune cells in the lymph nodes of patients with AITL and PTCL, NOS. To do this, we have developed an innovative methodology based on the use of spectral flow cytometry.

We could demonstrate an immune imbalance in PTCL samples compared to non-tumor lymphoid tissues. An expansion of LT, Natural Killer cells and dendritic cells, at the expense of B lymphocytes, could be detected. However, the majority of CD8⁺ T cells displayed an exhausted phenotype, suggesting an impairment of their anti-tumor function. This observation, combined with a strong expansion of FOXP3⁺ regulatory T cells (Treg), suggests that the PTCL microenvironment is subject to a profound immunosuppression supporting tumor progression, and would therefore be a suitable candidate for immunotherapies. In this sense, we were able to demonstrate expression of CTLA-4, ICOS or OX-40, restricted to tumor cells and Tregs, thus constituting potential therapeutic targets. On the other hand, we detected a generalized increase in the expression of the immunosuppressive ecto-enzyme CD39, in the tissues of PTCL patients. A retrospective analysis by multi-immunofluorescence enabled the association between the high expression of CD39 by T lymphocytes and a poor prognosis for patients.

Our work highlights an alteration of the immune response in the microenvironment of AITL and PTCL, NOS, as well as potential therapeutic targets and a prognostic biomarker. Furthermore, our data support the use of spectral cytometry for the study of the immune response in hematologic malignancies. In this sense, we have also validated its use in type B chronic lymphocytic leukemia, in patients treated with Ibrutinib in response or relapse status; in this context it appears that the response status does not profoundly alter the distribution and phenotype of T or NK cells.

Keywords: T-cell lymphoma, immune microenvironment, immunotherapy, spectral cytometry

Table des matières

Résumé en français.....	2
Summary in english.....	3
Laboratoire	8
Remerciements	9
Liste des Abréviations	13
Liste des Figures.....	17
Liste des Tableaux	17
Introduction Bibliographique	18
I. LES LYMPHOMES T	19
A. Généralités.....	19
1. Origines	19
2. Prévalence et épidémiologie.....	19
B. Les PTCL AITL et TFH.....	22
1. Présentation clinique et biologique.....	22
2. Diagnostic et présentation anatomopathologique.....	23
a) Histologie et morphologie	23
b) Immunohistochimie et origine cellulaire.....	23
(1) Micro-environnement	23
(2) Cellules tumorales	24
(3) Confirmation de l'origine des cellules tumorales.....	25
c) Clonalité T	26
d) Cytogénétique.....	26
e) Biologie moléculaire et modèles précliniques.....	26
C. Les PTCL-NOS	28
1. Présentation clinique et biologique.....	28
2. Diagnostic.....	29

a)	Histologie et morphologie	29
b)	Immunohistochimie	29
c)	Cytogénétique.....	30
d)	Biologie moléculaire.....	30
e)	Profil d'expression génique	30
D.	Facteurs pronostiques dans les PTCL.....	31
1.	Stade et imagerie	31
2.	Caractéristiques tumorales.....	31
3.	IPI et autres scores pronostiques clinico-biologiques.....	32
E.	Traitements	33
1.	Le traitement de référence en première ligne : CHOP	33
2.	Place de l'autogreffe et de l'allogreffe	33
3.	Immunothérapie dans les PTCL	34
4.	Autres modalités thérapeutiques et perspectives	34
II.	IMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE DANS LE CANCER.....	36
A.	Immunité innée et cancer.....	36
1.	Macrophages.....	37
a)	Fonctions dans le cancer.....	37
b)	Ciblage thérapeutique des Macrophages	37
2.	DC	38
a)	Impact dans le cancer	38
b)	Ciblage des DC.....	39
3.	Cellules NK	40
a)	Impact dans le cancer	40
b)	NK et immunothérapies.....	40
B.	Immunité adaptative et cancer.....	41
1.	Lymphocytes B et immunité humorale	41
2.	Lymphocytes T.....	42

a)	Activation des LT	42
b)	Les LT CD4 ⁺ conventionnels	44
	(1) Th1.....	44
	(2) Th2.....	44
	(3) Th9.....	45
	(4) Th17.....	45
	(5) TFH.....	46
	(6) T cytotoxiques	46
c)	Lymphocytes T régulateurs	47
	(1) Généralités	47
	(2) Impact dans le cancer	48
d)	Lymphocytes T CD8 ⁺	48
	(1) LT CD8 ⁺ Cytotoxiques	49
	(2) LT CD8 ⁺ Mémoires	50
	(3) LT CD8 ⁺ « épuisés ».....	50
C.	Ciblage thérapeutique des récepteurs (checkpoints) activateurs et inhibiteurs sur les LT	51
	1. CTLA-4	52
	2. PD-1.....	54
	3. TIM-3	56
	4. LAG-3.....	57
	5. TIGIT et DNAM-1	58
	6. ICOS.....	59
	7. TNFRSF	60
	a) OX40 (CD134).....	60
	b) CD137 (4-1BB)	61
	c) TNFR2.....	62
D.	Modulation du métabolisme des LT par la voie CD39/CD73/A2A-BR	63
E.	Spécificité d'expression des checkpoints et efficacité thérapeutique	64

F.	Autres thérapies basées sur les LT : CAR T-cells et Ac bispécifiques.....	65
III.	Paysage immunitaire et immunothérapie des PTCL	66
A.	Composition et impact de la réponse immunitaire dans le PTCL.	66
B.	Immunothérapies dans le PTCL	67
C.	Préambule aux résultats	68
	Objectifs du travail de thèse	69
	Article 1 : Deep phenotyping of nodal T-cell lymphomas unravels immune alterations and therapeutic targets (Soumis dans leukemia : September 2023)	72
	Projet Annexe : Etude du phénotype immunitaire chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B développant une résistance à l'Ibrutinib (manuscrit en préparation)	113
	DISCUSSION	121
I.	Une technique innovante d'étude du microenvironnement immunitaire.....	121
II.	Une ambiance générale altérée	122
III.	Cellules T conventionnelles et tumorales : une frontière incertaine.....	123
IV.	Une immunosuppression généralisée dans le PTCL	127
V.	Des cibles potentielles : choisir l'élus ?	128
A.	Duplicité et fourberie.....	128
B.	Des alliés potentiels chez l'ennemi	129
C.	CD39 : un avenir prometteur	130
VI.	Conclusion et perspectives	134
	Références Bibliographiques.....	137
	Annexe 1. Revue : Stéphane P, Lautreite R, Voisin A, Grinberg-Bleyer Y. Transcriptional Control of Regulatory T Cells in Cancer: Toward Therapeutic Targeting?. <i>Cancers (Basel)</i> . 2020;12(11):3194. Published 2020 Oct 30. doi:10.3390/cancers12113194	176

Laboratoire

Equipe « Régulation moléculaire de l'immunité dans le cancer »

Dirigée par Yenkel Grinberg-Bleyer

CRCL – Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

UMR INSERM 1052 – CNRS 5286

Université Claude Bernard Lyon 1

LabEx DEV2CAN

Centre Léon Bérard – Cheney B

28 rue Laënnec, 69373 Lyon Cedex 08

Remerciements

Aux membres du jury

A Monsieur Le Professeur Pierre SUJOBERT,

Tu me fais l'honneur de présider ce jury. Je te remercie pour l'intérêt et le temps consacré à ce travail. Je te remercie également pour ton écoute et tes conseils lors de mes comités de suivi de thèse et de mes questions tant sur ce projet que sur mon cursus professionnel.

A Madame la Professeure Catherine THIEBLEMONT,

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapportrice. Merci pour votre intérêt, votre expertise et votre soutien dans mes projets. Merci de m'aider à les concrétiser par votre constante disponibilité et votre investissement. Merci pour votre bienveillance et votre confiance. Vous avez confirmé mon attrait pour la clinique et la recherche dans le lymphome.

A Monsieur le Professeur José COHEN,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteur. Je vous remercie pour l'intérêt et le temps que vous avez consacré à ce travail. Merci de me faire bénéficier de votre expertise et de vos connaissances approfondies.

A Madame la Professeure Laurence de LEVAL,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail en qualité d'examinatrice. Je vous remercie pour votre temps, vos conseils, votre aide et votre expertise dans la réalisation de ce projet portant sur les lymphomes T. Merci également pour votre intérêt et votre aide dans mon souhait de poursuivre la recherche dans ce domaine.

A Madame la Professeure Maha AYYOUB,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail en qualité d'examinatrice. Je vous remercie pour l'intérêt et le temps que vous avez consacré à ce travail. Merci de me faire bénéficier de votre expertise et de vos connaissances approfondies.

A Yenkel,

Tu m'as fait l'honneur de diriger ce travail. Merci de m'avoir accueilli dans le « monde » de la recherche et de m'avoir fait confiance en montant ce projet avec moi. Merci pour tes connaissances infinies en immunologie et ton investissement dans ma formation. Merci de m'avoir accompagné et guidé tout au long de ce travail.

A notre équipe du CRCL

A Allison, mon phare, ma première de cordée dans la recherche ! Merci de m'avoir accueilli et coaché à mon arrivée dans cette nouvelle aventure ! Merci pour ton amitié fidèle et ton soutien ! N'oublie pas la Bretagne toujours première !

A Julie, ma co-master et notre chef à tous ! En amitié ou professionnellement : Merci pour ton efficacité en toute circonstance, pour ton dynamisme à toute épreuve, ton aide et ta fidélité infaillible. Prochaine destination à organiser : Boston !

A Raphaëlle, ma co-doctorante et notre Parisienne-Corse ! Merci pour ton arrivée dans l'équipe et notre partage de la découverte du monde de la recherche ! Merci pour ton amitié fidèle, ton enjouement permanent, nos discussions parfois animées, notre binôme imbattable au unlock !

A Guilhem, mon voisin de bureau ! Merci pour ton amitié, tes conseils, ton aide et ton accueil dans l'équipe. Sois assuré que je reprendrai le dessus à Age Of !

A Marlène, notre maillon indispensable ! Merci pour ta bienveillance, ton calme, ta gentillesse et ton altruisme.

A Khaled, la relève ! Merci pour ton enthousiasme et ta sympathie !

A nos voisins Julien et son équipe, Valentin, Ossama, Ramdane, Saïdi, merci pour votre sympathie et votre amitié. Merci pour nos partages tant professionnels que sportifs. Merci pour votre soutien au cours de ces 3 années.

Aux équipes et personnes qui ont contribué à ce projet

A la Fondation pour la Recherche Médicale, pour son soutien financier (dossier FDM202006011181).

A l'équipe de cytométrie, Thibault, Priscillia et Agathe, merci pour vos connaissances, votre passion, et votre patience.

A l'équipe d'anatomopathologie et d'hématologie clinique du CHU de Lyon Sud et l'équipe d'immunobiologie du lymphome, à Madame le Professeur Alexandra TRAVERSE-GLEHEN, à Monsieur le Professeur Emmanuel BACHY, à Monsieur Laurent GENESTIER, à Monsieur Jimmy PERROT, à Madame Mathilde BARDOU et à Madame Garance TONDEUR, merci pour votre collaboration, votre disponibilité, votre passion et vos nombreux conseils.

A l'équipe de l'Institut Carnot CALYM (projet de collection CeVI et TENOMIC) et les membres du LYSA, à Madame le Professeur Laurence de LEVAL, à Messieurs les Professeurs Philippe GAULARD et François LEMONNIER, à Monsieur Edoardo MISSIAGLIA, merci pour votre collaboration, vos connaissances et vos conseils.

A l'équipe Plasticité tumorale dans le mélanome, à Madame Julie CAMEL et à Monsieur Maxime GRIMONT, merci pour votre temps, vos conseils et vos échanges.

A l'équipe d'hématologie clinique du Centre Léon Bérard, à Madame le Docteur Anne-Sophie MICHALLET et Monsieur le Docteur Yann GUILLERMIN, merci pour votre intérêt dans notre projet, votre collaboration et vos conseils pour le projet sur le LLC.

A tout ceux qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours

A Monsieur le Docteur Olivier CASASNOVAS, merci pour votre soutien tout au long de mon parcours, de l'internat à la thèse de science. Merci pour votre disponibilité, vos connaissances et votre investissement dans ma formation. Par votre passion, vous m'avez donné envie et aidé à me lancer dans le monde du lymphome !

Aux médecins et aux personnes de toutes les équipes qui m'ont accueilli, soutenu et qui ont contribué à affermir mon projet d'hématologie tant en recherche qu'en clinique, aux services d'hématologie-oncologie de l'hôpital Saint Louis, d'hématologie clinique et biologique du CHU de Dijon, d'hématologie du CLB, de Réanimation de l'hôpital Percy, de Neurologie, de Réanimation et de Néphrologie du CH de Macon.

A nos patients, à qui notre recherche est destinée, merci pour leur confiance et leur courage.

A ma famille et mes amis

A mes parents, merci pour votre soutien indéfectible. Merci pour votre amour et votre éducation qui ont conduit mes pas. Merci d'avoir suscité chez moi ce souci de l'autre. Merci maman pour les relectures, il ne fait aucun doute que tu maîtrises maintenant le sujet !

A mon frère, Thomas, et mes sœurs, Anne et Mathilde, merci pour ce quatuor que nous sommes. Comme nous formions une équipe à Sainte Elisabeth, merci de savoir vous mettre sur la ligne de départ quand il le faut. Parce que nos différences nous rassemblent, merci d'être qui vous êtes. Soyez sûr que je vous aime comme cela.

A ma belle-sœur Caroline et mes beaux-frères Guillaume et François, merci de venir consolider le socle Stéphan. Merci de m'accepter dans vos valises en vacances, d'avoir toujours une chambre chez vous pour moi que ce soit en pleine épidémie de COVID, pour des week-end dans les alpes du sud, ou pour des passages furtifs. Merci pour vos familles respectives qui n'hésitent pas non plus à m'accueillir et à me soutenir !

Merci aux prémices de la nouvelle génération, Elouan, premier neveu, merci pour tes « tonton Pierre » et tes « gros » câlins.

A mes oncles et tantes et mes cousins. Quelles joies de faire partie du clan Castaignet ! Merci pour votre soutien à chacun, merci pour nos cousinades ! Une spéciale dédicace à Agathe et Manu, merci d'être un foyer d'accueil !

A mes amis, à Timothée, Marguerite, Ophélie, FX, JB, PM, Hubert, Gaël, Matthieu, Anne-Charlotte, Théophile, Jeanne, Madeleine, France, Sébastien, Pauline, François, Blandine, Anne-Sophie, Cécile, Juliette, Emmanuel, Erwan, Briec, Agathe, Tifenn, Brendan, Julie, Raphaëlle, Allison, Pénélope, Benjamin, Alex, Camille, Tyfanie, Romain, Caroline, Mathilde, Juliette et Caterina. Merci pour votre amitié, votre soutien et votre fidélité. Chacun d'entre vous me fait grandir. Restez comme vous êtes !

Liste des Abréviations

Ac : Anticorps	CCL : Chemokine (C-C motif) ligand
AcM : Anticorps monoclonale	CD : Cluster de différenciation
ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps	cDC : Cellule dendritique conventionnelle
ADCP : Phagocytose à médiation cellulaire dépendante des anticorps	CG : Centre germinatif
ADP : Adénosine diphosphate	CGH : Puce d'hybridation génomique comparative
Ag : Antigène	CHOP : Cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prédisonne
AHAI : Anémie hémolytique auto-immune	CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
AITL : Lymphome T angio-immunoblastique	CPA : Cellule présentatrice d'antigène
ALCL : Lymphome anaplasique à grandes cellules	CPNPC : Cancer pulmonaire non à petites cellules
ALK : Anaplastic lymphoma kinase	CRP : Protéine C-réactive
AMM : Autorisation de mise sur le marché	CSF : Colony stimulating factor-1
AMP : Adénosine monophosphate	CSF1R : Colony stimulating factor-1 receptor
ANG2 : Angiopoietin 2	CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
ARNm : ARN messenger	CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand
ASCT : Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques	CXCR : Chemokine (C-X-C motif) receptor
ATAC-seq : Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing	CytoTOF : Cytométrie de masse
ATLL : Leucémie/lymphome à cellule T de l'adulte	DAG : Diacylglycerol
ATP : Adénosine triphosphate	DAMPS : Motifs moléculaires associés aux dégâts
BCL : B cell lymphoma	DC : cellule dendritique
BCR : Récepteur des cellules B	DLBCL : Lymphome B diffus à grandes cellules
BTK : Bruton tyrosine kinase	DLT : Toxicité limitant la dose
CAR : Chimeric Antigen Receptor	DNAM-1 : DNAX accessory molecule-1
CCR : Chemokine (C-C motif) receptor	DNMT3A : ADN methyltransferase 3 alpha
	EATL : Lymphome T associé à une entéropathie

EBV : Virus d'Ebstein-Barr	ITK : IL-2 inducible T-cell Kinase
EOMES : Eomésodermine	ITSM : Tyrosine-based switch motif
FasL : Ligand de Fas	JAK : Janus kinase
FDA : Food and Drug Administration	KAR : K cell activating receptors
FDC : Cellule dendritique folliculaire	KIR : K cell inhibitory receptors
FDG : 18F-Fluoro-deoxyglucose	LAG-3 : Lymphocyte Activation Gene-3
FILO : French Innovate Leukemia Organization	LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique
FOXP3 : Forkhead Box Protein 3	LAM : Leucémie aiguë myéloblastique
FT : Facteur de transcription	LCK : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
GTP : Guanosine triphosphate	LCMV : Virus de la chorioméningite lymphoïde
GVH : Graft versus Host	LDH : Lactates déshydrogénases
GVL : Graft versus leukemia	LH : Lymphome de Hodgkin
GZMB : granzyme B	LLC : Leucémie lymphoïde chronique
HDACi : Inhibiteur d'histone deacetylase	LNH : Lymphome non Hodgkinien
HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2	LB : Lymphocyte B
ICOS : Inducible T-cell costimulator	LT : Lymphocyte T
IDH2 : Isocitrate deshydrogenase NADP(+) 2	MDSC : Cellules myéloïdes suppressives
IFN : Interféron	moDC : Cellule dendritique monocytaire
Ig : Immunoglobuline	mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
IHC : Immunohistochimie	NFAT : Nuclear factor of activated T-cells
IL : Interleukine	NF-kB : Nuclear Factor of the k-chain in B-cells
ILSG : International Lymphoma Study Group	NK : Cellules Natural Killer
IPI : Index pronostique international	NKTCL : Lymphome à cellule T/NK
IP3 : Inositol triphosphate	NOS : Sans autre spécificité
iTreg : Treg induit	nTreg : Treg naturel
ITAM : Tyrosine-based Activating Motif	NUFIP2 : Nuclear FMR1 Interacting Protein 2
ITIM : Tyrosine-based inhibitory motif	OMS : Organisation mondiale de la santé

PAMPS : Motifs moléculaires associés aux pathogènes	TCM : LT central mémoire
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde	TCR : Récepteur des lymphocytes T
Pdcd1 : Programmed cell death 1 gene	TEM : LT effecteur mémoire
PDGFR α : Platelet-derived growth factor receptor alpha	TEP : Tomographie par émission de positons
PD-1 : Programmed death 1	TET2 : Tet Methylcytosine dioxygenase 2
PD-L1 : Programmed death ligand 1	Tex : LT « épuisé »
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase	TFH : Cellule T folliculaire helper
PP2A : Protéine phosphatase 2	TGF : Transforming growth factor
PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires	Th : Lymphocyte T helper
PS : Performance status	TIA-1 : Protéine de liaison à l'ARN associée aux granules cytotoxiques
PTCL : Lymphome à cellules T périphériques	TIGIT : T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
PTI : Purpura thrombopénique immunologique	TIL : Lymphocytes infiltrant la tumeur
RC : Réponse complète	TIM-3 : T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3
RHOA : Ras homolog family member A	TLR : Récepteur de type Toll
R/R : Rechute ou réfractaire	TLS : Structure lymphoïde tertiaire
scRNA-seq : séquençage ARN à l'échelle de la cellule unique	TME : Microenvironnement tumoral
SG : Survie globale	TNFR : Récepteur du facteur de nécrose tumorale
SHP2 : Src homology-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2	TNFS : Superfamille des facteurs de nécrose tumorale
SS : Syndrome de Sézary	TOX : Thymocyte selection-associated high mobility group box protein
SSP : Survie sans progression	Tpex : LT épuisé partiellement
STAT : Signal transducers and activators of transcription	Treg : Lymphocyte T régulateur
SYK : Spleen tyrosine kinase	TRG : Taux de réponse globale
TAM : Macrophages associés aux tumeurs	TRM : LT résident mémoire
TBX21 : T-box Transcription Factor 21	T-bet : T box expressed in T cells
TCF1 : T cell factor 1	VEGF : Vascular endothelial growth factor

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des Figures

Figure 1. Distribution des lymphomes T périphériques en France au sein des lymphomes nodaux et extra nodaux.....	21
Figure 2. Caractéristiques phénotypiques, aberrations génétiques et stratégies thérapeutiques potentielles des PTCL-TFH.	35
Figure 3. Différenciation physiologique et pathologique des LT CD8+.	49
Figure 4. Quelques checkpoints activateurs et inhibiteurs des LT étudiés au cours de mon projet de thèse.	52
Figure 5. Identification des cellules tumorales difficiles.	125
Figure 6. Niveau d'expression de PD-1 au sein des AITL et Amygdales.....	126
Figure 7. Niveau d'expression de CD39 sur les lymphocytes T des AITL en IHC.	131
Figure 8. L'inhibition de CD39 restaure la prolifération et la cytotoxicité des LT CD8 ⁺ des PTCL nodaux.....	133

Liste des Tableaux

Tableau 1. Classification 2022 des tumeurs lymphoïdes T/NK mature de l'adulte.	20
Tableau 2. Expression simplifiée par les cellules immunitaires des checkpoints.....	65
Tableau 3. Caractéristiques des patients de la cohorte LLC.....	116

Introduction Bibliographique

I. LES LYMPHOMES T

A. Généralités

1. Origines

Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des néoplasmes dérivés des cellules T post-thymiques ou des cellules Natural Killer (NK) matures. Rares, ils représentent 10 à 15% des lymphomes non hodgkinien (LNH). Il s'agit de maladies très hétérogènes dont l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi la première classification en 2001 (1). Les progrès des deux dernières décennies, notamment l'étude des profils d'expression génique, ont permis plusieurs révisions de cette classification. La dernière mise à jour, de 2022, est présentée dans le tableau 1 (2). Elle élargit le groupe sous l'entité « Proliférations et lymphomes à cellules lymphoïdes T et NK », incluant les lésions ressemblant à des tumeurs avec prédominance de lymphocytes T (LT), les tumeurs des précurseurs des lymphocytes T et les néoplasmes à cellules T/NK matures (2). Ces derniers peuvent se diviser en 4 sous-entités : leucémique, cutané, extra-nodal et nodal ; pour un total de 9 familles (2). Les lymphomes T nodaux, c'est-à-dire affectant les ganglions lymphatiques, sont les plus fréquents et regroupent 3 familles : les PTCL à cellules T folliculaires helper (TFH) avec 3 entités (Angio-immunoblastiques (AITL), TFH de type folliculaire et TFH sans autre spécificité) ; les PTCL anaplasiques à grandes cellules (ALCL) avec 2 entités (Anaplasique lymphoma kinase (ALK) positif et ALK négatif) ; et enfin les PTCL sans autre spécificité (NOS) (2). Mon travail de thèse s'est concentré sur les PTCL-AITL/TFH et PTCL-NOS, c'est donc ces entités que j'aborderai en détail.

2. Prévalence et épidémiologie

L'International Peripheral-T cell Lymphoma Project a publié en 2008 la plus large cohorte de PTCL à ce jour (3). 1314 patients âgés de 19 ans et plus, ont été inclus avec un diagnostic de PTCL retenu pour 1153 d'entre eux. Ce projet rapporte que les sous-types les plus fréquents sont les PTCL-NOS (25.9%) et les AITL (18.5%) (3). Cependant cette répartition est dépendante de la géographie. En effet alors que les lymphomes NK/T extra-ganglionnaires et les leucémies/lymphomes de l'adulte à HTLV1 représentaient respectivement 4 à 5% et 1 à 2% des PTCL dans les pays occidentaux, ils représentent chacun plus de 20% en Asie (3). En France une étude du réseau national des lymphomes indique que les AITL sont les PTCL les plus fréquents (4). L'incidence des lymphomes T augmente avec l'âge, avec un âge médian au diagnostic de 62 ans. La répartition des lymphomes T au sein des autres lymphomes est résumée dans la figure 1.

Tableau 1. Classification 2022 des tumeurs lymphoïdes T/NK mature de l'adulte.

(D'après Alaggio R. et al., *Leukemia* 2022 (2)). Abréviations : NK, Natural Killer ; ALCL, lymphome anaplasique à grandes cellules ; PTCL, lymphome T périphérique ; TFH, T folliculaire helper ; NOS, sans autre spécificité ; CD, Cluster de différenciation.

Leucémies T/NK matures	Leucémie T-prolymphocytaire Leucémie à grands lymphocytes granuleux T Leucémie à grands lymphocytes granuleux NK Leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte syndrome de Sézary Leucémie NK d'évolution agressive
Lymphomes cutanés primitifs à cellules T	Trouble lymphoprolifératif cutané primitif à petites ou moyennes cellules CD4 ⁺ Trouble lymphoprolifératif cutané primitif acral CD8 ⁺ Mycosis fongoïde Papulose lymphomatoïde Lymphome anaplasique à grandes cellules cutanées primitif Lymphome T de type panniculite sous-cutanée Lymphome T gamma/delta cutané primitif Lymphome T cutané épidermotrope CD8 ⁺ cytotoxique d'évolution agressive Lymphome T cutané primitif périphérique, NOS
Lymphomes/proliférations lymphoïdes T/NK intestinaux	Lymphome T indolent du tractus gastro-intestinal Trouble lymphoprolifératif indolent à cellules NK du tractus gastro-intestinal Lymphome T associé à l'entéropathie Lymphome T intestinal épithéliotrope monomorphe Lymphome intestinal à cellules T, NOS
Lymphome T hépatosplénique	
Lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL)	ALCL ALK ⁺ ALCL ALK ⁻ ALCL associé aux implants mammaires
Lymphome T périphérique nodal (PTCL) à cellules TFH	Lymphome T angio-immunoblastique PTCL-TFH de type folliculaire PTCL-NOS de type TFH
PTCL-NOS	

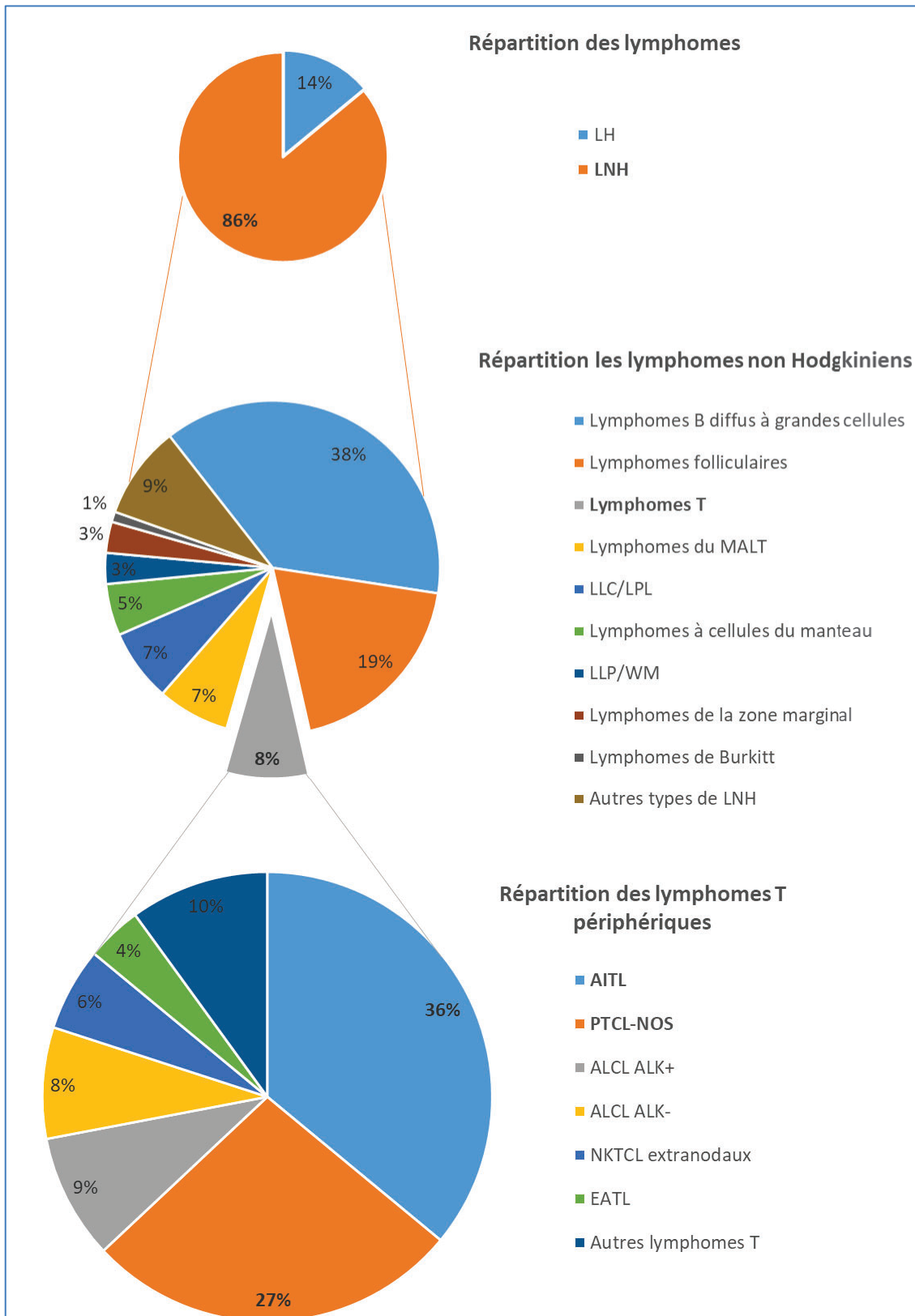


Figure 1. Distribution des lymphomes T périphériques en France au sein des lymphomes nodaux et extra nodaux. (D'après Laurent C. et al., J Clin Oncol 2017 (4)). Abréviations : LH, lymphome de Hodgkin ; LNH, lymphome non Hodgkinien ; MALT, tissu lymphoïde associé aux muqueuses ; LLC, leucémie lymphoïde chronique ; LPL, lymphome à petits lymphocytes ; LLP/WM, lymphome lymphoplasmocytaire/Macroglobulinémie de Waldenström ; PTCL, lymphome T périphérique ; NOS, sans autre spécificité ; AITL, lymphome T angio-immunoblastique ; ALCL, lymphome anaplasique à grandes cellules ; ALK, Anaplasique lymphoma kinase ; NKTCL, lymphome à cellule T/NK ; NK, natural killer ; EATL, lymphome T associé à une entéropathie.

B. Les PTCL AITL et TFH

1. *Présentation clinique et biologique*

Les AITL, initialement décrites par Fizzera et al. en 1974 comme la lymphadénopathie angio-immunoblastique avec dysprotéïnémie, représentent entre 15 et 20% des PTCL dans le monde et jusqu'à 36% en France (3–5).

Plusieurs études se sont attachées à décrire les caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant un AITL (3,6,7). La littérature rapporte un âge médian au diagnostic entre 60 et 65 ans, mais pouvant également toucher une population jeune. Avec un sexe ratio entre 1.2 et 1.5, il existe une prédominance masculine. Environ 1 patient sur 2 a un état général conservé avec un statut de performance (PS) < 2 au diagnostic. Les patients peuvent présenter des atteintes ganglionnaires et extraganglionnaires. 70 à 80% des patients présentent des signes généraux de types symptômes B : fièvre, perte de poids et sueurs nocturnes. Le stade de la maladie repose sur la classification Ann Arbor, dépendante du nombre d'atteinte ganglionnaire, de leur localisation de part et d'autre du diaphragme et d'atteinte extra-ganglionnaire (8). Dans la majorité des cas (> 80%) la maladie est disséminée selon le stade Ann Arbor simplifiée de 2014 (stade III ou IV) (3,6,7). Plus d'un patient sur deux présente une atteinte splénique, 30 à 50% un envahissement médullaire et ¼ une hépatomégalie. Les autres manifestations cliniques comprennent les atteintes cutanées chez 45% des patients, polymorphes avec une majorité d'éruption morbilliforme maculopapuleuse (3,6,7). Il existe également des manifestations rhumatologiques dans plus de 15% des AITL, à type de polyarthrites associées ou non à des myalgies. Il est décrit plus rarement des signes neurologiques divers chez environ 10% des patients (syndrome confusionnel, polynévrite, surdité...), des atteintes respiratoires et pulmonaires et la présence d'ascite (3,6,7).

Au niveau biologique, les examens retrouvent dans plus de 50% des cas des cytopénies, principalement une anémie et/ou une lymphopénie et moins fréquemment une thrombopénie (6,9). Ces cytopénies peuvent correspondre à des manifestations dysimmunitaires. Ainsi plus de 30% des anémies sont associées à la présence d'anticorps anti-globules rouges mis en évidence par un test de Coombs positif (6,9). Au sein de la cohorte rétrospective de 77 patients du centre hospitalier de Lyon Sud et du Centre Léon Bérard (Lyon, France), il était décelé chez 20% des patients une anémie hémolytique auto-immune (AHAI), chez 7% un purpura thrombopénique immunologique (PTI) et un Syndrome d'Evans chez 3 patients (2%) associant une AHAI et un PTI (9). Dans la majeure partie des cas les cytopénies sont diagnostiquées de manière concomitante à l'AITL, mais elles peuvent parfois précéder de plusieurs mois le diagnostic initial (10). A noter qu'en cas de rechute d'une cytopénie

auto-immune initialement présente, elle est toujours liée à la rechute de l'AITL (10). Les autres signes biologiques comprennent une élévation des lactates déshydrogénases (LDH) et/ou un syndrome inflammatoire, souligné par une protéine C-réactive (CRP) élevée, et/ou une augmentation de la B2-microglobuline chez plus de 2/3 des patients et une hyperéosinophilie chez un tiers des patients (6,9). De même la moitié des patients présentent une hypergammaglobulinémie dont 27% une immunoglobuline monoclonale circulante (6,9). Enfin des cellules atypiques circulantes sont également retrouvées dans un tiers des cas (9).

2. *Diagnostic et présentation anatomopathologique*

a) *Histologie et morphologie*

La biopsie est essentielle. Elle permet l'examen anatomopathologique avec l'analyse histologique qui affirme le diagnostic. Il met en évidence un infiltrat polymorphe diffus effaçant partiellement l'architecture ganglionnaire, avec une perte des follicules à cellules B très fréquente (11,12). Il permet de définir les trois modèles architecturaux des atteintes ganglionnaires (11,13,14) : le modèle I, le moins fréquent dans lequel il existe des follicules hyperplasiques ; le modèle II avec un appauvrissement des follicules et le modèle III sans follicule. Dans près de la totalité des cas, il est retrouvé une prolifération anormale de cellules dendritiques folliculaires (FDC) (11–13). Elle varie d'un individu à l'autre et d'un modèle à l'autre, d'irrégulier focal à très exubérant. L'infiltrat comprend également des histiocytes, des cellules épithélioïdes, des éosinophiles, des macrophages, des immunoblastes dont notamment des immunoblastes B, précurseurs des plasmocytes, et des plasmocytes (11–13). Au sein de cet infiltrat on retrouve des lymphocytes T néoplasiques de taille petite à moyenne et des LT réactionnels. Enfin il est également retrouvé une prolifération de vaisseaux sanguins. Les PTCL TFH de type folliculaire et NOS se différencient des AITL par l'absence dans la majorité des cas de la prolifération de vaisseaux sanguins et des cellules dendritiques folliculaires (15).

Il s'agit cependant d'un diagnostic difficile, avec des erreurs initiales sur l'histologie pouvant être supérieures à 30% (9). Les diagnostics différentiels comprennent notamment les lymphadénopathies réactionnelles et les autres sous-types de lymphome (9). L'examen histologique doit être complété par des tests supplémentaires.

b) *Immunohistochimie et origine cellulaire*

(1) *Micro-environnement*

Le développement de l'immunophénotypage vient en renfort. L'utilisation des marqueur du cluster de différenciation (CD) 21, CD23 ou CD35, permettent de visualiser et confirmer la

prolifération anormale des cellules dendritiques folliculaires (6,11,12). Les marqueurs des lymphocytes B, CD20 et CD79a, montrent une proportion variable de grandes cellules B de types blastes pouvant parfois mimer un lymphome à grandes cellules B ou les cellules de Reed Sternberg retrouvées dans les lymphomes de Hodgkin (6,11,12,14). Ces immunoblastes B sont souvent CD30 positives (16). La recherche d'une infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) via hybridation in situ EBER retrouve un nombre variable de ces cellules positives dans plus de 75% des cas (6,12). Les marqueurs des macrophages retrouvent une accumulation de macrophages M2 (17).

Concernant les LT non tumoraux infiltrant la tumeur, il est décrit dans certaines études une déplétion en LT régulateurs (Treg), ceux présents ayant de plus un phénotype naïf, et une accumulation de LT Th17 et de production de leurs cytokines (16,18), comme nous le verrons ensuite en détails.

(2) Cellules tumorales

L'analyse de l'expression des marqueurs de lymphocytes T permet d'illustrer le phénotype des cellules tumorales. Celles-ci présentent généralement un récepteur des lymphocytes T (TCR) $\alpha\beta$ (13). Elles expriment majoritairement le marqueur CD4, bien que parfois de manière faible ou hétérogène (19). En revanche elles n'expriment pas le CD8 (13,19). Concernant les autres antigènes (Ag) pan-T (CD3, CD5, CD7), elles peuvent les exprimer plus faiblement ou perdre leur expression (6,14,20). La perte du CD7 est la plus fréquente (6,20). Dans la majorité des cas au moins une partie des cellules tumorales expriment de forts niveaux de CD10, qui n'est pas exprimé par les lymphocytes T matures normaux (12,21,22). De plus ce marqueur semble spécifique des AITL par rapport à d'autres PTCL, comme reporté au sein d'une cohorte japonaise de 490 patients présentant un lymphome à cellules T ou NK (21). Cette spécificité était également retrouvée en immunohistochimie (IHC) dans d'autres études comparées aux autres types de lymphomes T et aux hyperplasies ganglionnaires (12,23). Le marqueur CD30 est exprimé par certains AITL, comme montré dans des études par cytométrie en flux et IHC (21,24). Cette découverte a conduit à l'utilisation du Brentuximab Vedotin, un conjugué drogue-anticorps combinant un anticorps monoclonal anti-CD30 et un anti-mitotique, dans les AITL, avec succès (25).

Il a été établi récemment l'origine ontogénique de l'AITL à partir des cellules TFH, puisque les cellules tumorales expriment plusieurs antigènes des cellules TFH normales. Ainsi, l'inducible T-cell costimulator (ICOS), un marqueur d'activation fortement exprimé par les TFH normaux, est également exprimé par les AITL et par les PTCL-TFH de manière spécifique en comparaison aux autres lymphomes (26). Il en est de même pour le programmed death 1 (PD-1) (27). Une analyse récente par cytométrie en flux du Memorial Sloan Kettering souligne que le niveau d'expression de

PD-1 est plus élevé dans les cellules tumorales comparées aux cellules non tumorales et pourrait permettre d'aider à leur identification (28). La production de chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 13, chimiokine des cellules TFH, et l'expression de son récepteur CXCR5, sont augmentées dans les cellules tumorales (29,30). Enfin elles sur-expriment le facteur de transcription (FT) caractéristique des cellules TFH : B cell lymphoma (BCL) 6 (14). Des niveaux élevés d'ARN messager (ARNm) *c-MAF*, autre facteur de transcription caractéristique des LT TFH et d'expression de la protéine ont également été détectés dans une grande majorité des AITL (31,32). Or une surexpression de *c-Maf* par les LT de souris transgéniques entraîne le développement in vitro de lymphome à cellule T, démontrant un rôle de *c-Maf* dans le développement des AITL (32).

Ainsi ces marqueurs sont devenus essentiels dans le diagnostic des AITL. L'utilisation combinée des immunomarquages de CD10, CXCL13 et c-MAF semblait optimale pour le diagnostic de certitude des AITL et des PTCL-NOS dans une étude belge portant sur 97 PTCL (31). Dans le diagnostic de PTCL TFH, il est recommandé qu'au moins 2 marqueurs TFH soient exprimés (2).

(3) Confirmation de l'origine des cellules tumorales

Les études transcriptomiques ont confirmé la parenté des cellules tumorales aux cellules TFH normales (33). Les analyses des profils d'expression génique des AITL ont permis de retrouver une surexpression des LT ayant une signature moléculaire typique des LT CD4⁺ périphériques activés avec différenciation fonctionnelle TFH (33). La signature transcriptomique des cellules néoplasiques était enrichie en gènes normalement exprimés par les cellules TFH dans 18 cas d'AITL (34).

Le modèle de souris *Roquin^{san/+}* présente une mutation ponctuelle hétérozygote dans le gène *Roquin/Rc3h1* conduisant à l'allèle mutant *Roquin^{san}* (35). L'ubiquitin-ligase ROQUIN, en présence de l'adaptateur NUFIP2 (Nuclear FMR1 Interacting Protein 2), promeut la dégradation de l'ARNm *Icos* (36,37). L'allèle *Roquin^{san}* réduit la dégradation de cet ARNm. Or l'expression aberrante d'ICOS sur les CD4⁺ contribue à une accumulation excessive de LT TFH (37). En dehors de toute maladie auto-immune, 53% de ces souris développent une lymphadénopathie asymétrique et une splénomégalie partageant des caractéristiques histologiques des AITL (effacement de l'architecture ganglionnaire, hypervascularisation, LT atypique, grandes cellules B, accumulation des histiocytes) (35). De même dans les ganglions non tumoraux et de taille normale des souris *Roquin^{san/+}*, le pourcentage de cellules TFH était plus important que dans les ganglions de cellules *Roquin^{+/+}*. Ces résultats in vivo viennent conforter les arguments de l'implication des cellules TFH dans le développement des AITL, et le lien entre ces 2 populations cellulaires.

Concernant les autres types de PTCL avec phénotype TFH, il est intéressant de noter que le NOS-TFH a longtemps été décrit dans le groupe des PTCL-NOS comme variant morphologique particulier : le variant folliculaire (14). Il n'est plus classé dans le groupe NOS depuis 2022 (2).

c) Clonalité T

Il est compliqué de déterminer si le tableau histologique correspond bien à un lymphome et non pas à une réaction immunitaire anormale (38,39). La mise en évidence d'un processus clonal des lymphocytes T a permis de le classer dans les lymphomes à cellules T, en tant que lymphome angio-immunoblastique dans les différentes classifications (Kiel, REAL et OMS) (1,40,41). L'équipe de Weiss et al. fut la première à étudier la clonalité des lymphocytes dans l'AITL (42). Elle a retrouvé par analyse d'hybridation de l'ADN des réarrangements clonaux des gènes du TCR dans 80% de leur cas. Ces résultats ont été corroborés par de nombreuses autres études rapportant une expansion mono ou oligoclonale des lymphocytes T dans la grande majorité des AITL (11,12,43,44).

d) Cytogénétique

Des aberrations chromosomiques clonales sont observées dans environ 70% des AITL, les plus fréquentes étant les trisomies 3, 5, 19, 21, les gains 3q, 5q, le gain d'un chromosome X et la perte de 6q et les réarrangements impliquant la localisation des gènes du TCR (9,13,45,46).

Une t(5;9)(q33 ;q22) a été initialement décrites dans quelques cas de PTCL avec phénotype TFH et ensuite dans des AITL (47,48). Or cette translocation entraîne la fusion des gènes de l'*IL2-inducible T-cell Kinase (ITK)* et de la *Spleen Tyrosine Kinase (SYK)* (49). Le gène de fusion *Itk-Syk* précédé d'une cassette *Rosa26LoxP-STOP-LoxP* a été incorporé dans des souris qui ont été croisées avec des souris CD4-Cre (49). Il en a résulté un modèle de souris transgéniques *Itk-Syk* CD4-Cre qui exprime le gène fusion dans les LT. Cette expression dans les LT a induit le développement de PTCL aux caractéristiques proches des PTCL humains (49). Il existait une perte de l'architecture normale de la rate par une infiltration de LT atypiques. Ces LT atypiques étaient dans 60% des cas CD4⁺, elles infiltraient également la moelle osseuse et d'autres organes (49).

e) Biologie moléculaire et modèles précliniques

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la transformation oncogénique des PTCL TFH (50).

Ils présentent des altérations fréquentes des gènes de la méthylation. Les plus fréquentes concernent les gènes impliqués dans la régulation épigénétique (51–55): le gène suppresseur de tumeur

Tet methylcytosine dioxygenase 2 (*TET2*) ; le gène de l'ADN Methyltransferase 3 alpha (*DNMT3A*) ; le gène de l'Isocitrate deshydrogenase *NADP(+)* 2 (*IDH2*). Ces mutations ne sont pas mutuellement exclusives, au contraire elles peuvent s'associer (52,54). Les plus fréquentes concernent *TET2* retrouvées dans plus de 80% des AITL (51–55). Une mutation de *DNMT3A* ou d'*IDH2* est dans la majorité des cas associée à une mutation de *TET2* (52,54).

L' autre mutation identifiée à l'heure actuelle est, pour la plus fréquente, la mutation du gène Ras homolog family member A (*RHOA*) (*G17V*) chez 50 à 70% des patients (55,56). Il code pour la protéine RHOA, membre de la famille des petites enzymes hydrolysant la guanosine triphosphate (GTP), qui se lie au GTP et participe à la migration cellulaire, la signalisation intracellulaire, la prolifération, la survie, la conformation du cytosquelette, la signalisation de la voie du TCR et joue un rôle central dans l'ontogenèse des LT (57). La forme mutante de RHOA(*G17V*) ne se lie pas au GTP et inhibe la signalisation RHOA (55). Elle est suspectée d'être un évènement moteur avec les mutations intéressant *TET2* dans le développement des PTCL TFH (57,58).

D'autres mutations moins fréquentes ont été retrouvées, telles que des mutations activatrices de la Janus kinase (JAK) 2 et du signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 et des mutations intéressant la signalisation du TCR (FYN, PLC γ 1, VAV1, CD28) (59). Il est intéressant de noter que les mutations et les défauts d'expression de P53 semblent peu fréquents dans les AITL (11,54). De même alors que l'expression de BCL6 est augmentée dans les AITL, et malgré son implication dans les lymphomes B, aucune mutation n'a encore été détectée (11).

Les modèles précliniques sont un pilier dans l'étude et la compréhension des maladies humaines et également dans les développements thérapeutiques. Or ils sont peu nombreux et les premiers modèles ne comportaient que peu de caractéristiques des AITL (35,60–62). Cependant la meilleure compréhension du développement oncogénique des PTCL TFH, et notamment la probable implication de *TET2* et *RHOA*, a permis des progrès au cours des dernières années (62). Le premier modèle, consistait en un transfert adoptif de LT *Tet2*^{-/-} *RhoA*^{G17V} dans des souris receveuses (58). Certaines des caractéristiques des AITL étaient alors décrites : croissance des nodules lymphatiques ; infiltration de cellules réactives dans les organes ; augmentation des LB dans le centre germinatif (CG) ; augmentation de l'expression par les LT de l'interleukine (IL) 6 ; cellules TFH majoritaire dans le pool CD4⁺ et à forte capacité proliférative ; Signature des LT, des tumeurs, proches des AITL. L'équipe de Tera Palomero a de son côté transplanté des moelles osseuses de souris *Tet2*^{KO} *RhoA*^{G17V} induisant un lymphome avec splénomégalie, perturbation des structures ganglionnaires, expansion des FDC et de la vascularisation, hyper prolifération des LT avec signature TFH et population de LT

monoclonaux (57). Un 3^{ème} modèle consiste en un croisement de souris CD4-*RhoA*^{G17V} avec des souris ayant une délétion de *Tet2* dans l'ensemble des cellules hématopoïétique (*Tet2*^{fl/fl}; *Vav-Cre*⁺) (63). Les souris obtenues ont été croisées avec des souris OT-II et immunisées tous les mois par de l'ovalbumine afin de mimer la stimulation chronique (63). Les caractéristiques chez les souris malades se rapprochaient également des AITL : lymphadénopathie ; splénomégalie ; adénomégalies ; formation de veinules ; augmentation des LT TFH avec réarrangement clonal du TCR γ (63). Ces modèles ont permis de confirmer les implications de ces mutations et d'approfondir la compréhension moléculaire des AITL avec notamment l'identification de l'implication de la voie Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) – mammalian Target Of Rapamycin (mTOR).

Dans un autre modèle, l'équipe d'Els Verhoeyen, a surexprimé la GAPDH dans les LT en aval du promoteur de la protéine kinase spécifique des lymphocytes (LcK) (*plck-GADPH*) (64). A 18 mois les souris ont développé des caractéristiques d'AITL : Eruption cutanée ; hépatosplénomégalie ; adénopathies ; infiltration par des LB, des cellules dendritiques (DC) et des LT CD4⁺ au profil phénotypique et génétique de TFH avec clonalité du TCR β et expression de cytokines inflammatoires. Une mutation de *RhoA*^{T37M} avec inactivation de sa liaison au GTP a été retrouvée dans ce modèle, mais pour le moment aucune mutation épigénétique n'a été détectée (64).

C. Les PTCL-NOS

Les PTCL-NOS représentent 25.9% des cas total de l'International Peripheral-T cell Lymphoma Project (3). Il s'agit d'un diagnostic d'exclusion.

1. Présentation clinique et biologique

Tout comme pour les AITL plusieurs études se sont attachées à décrire les caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant un PTCL-NOS (3,65–69). Il s'agit d'une maladie hétérogène sur le plan clinique et biologique. L'âge médian au diagnostic est d'environ 60 ans. Il existe une prédominance masculine avec un sexe ratio entre 1.5 et 1.9. Plus de 70% des patients ont au diagnostic un état général conservé avec un PS < 2. Alors que les signes généraux de type symptômes B sont présents chez 80% des AITL, ils sont présents chez 30-40% des PTCL-NOS. Dans la majorité des cas, plus de 60%, la maladie est disséminée avec un stade Ann Arbor III ou IV. Il existe une atteinte extra ganglionnaire chez plus de la moitié des patients. Les plus fréquentes sont l'envahissement médullaire (22% à 41%), une splénomégalie (24%) et une hépatomégalie (10% à 17%). Les autres manifestations cliniques comprennent les atteintes cutanées (12% à 18%) et pulmonaires (3% à 8%).

Au niveau biologique, une anémie et une thrombopénie sont retrouvées dans environ 1/4 des cas (65,67). 14% des patients présentent une hypergammaglobulinémie et une immunoglobuline monoclonale circulante dans 4% des cas (65). Des cellules atypiques circulantes sont retrouvées dans 10% des cas (65). Environ 50% des patients présentent une élévation des LDH (65–67). Au moins la moitié des patients présentent un syndrome inflammatoire, souligné par une CRP élevée, et/ou une augmentation de la B2-microglobuline (65).

Concernant les manifestations auto-immunes, elles sont peu décrites en comparaison aux AITL (70). Au sein de la cohorte de l'International Peripheral-T cell Lymphoma, une AHAI était retrouvée chez seulement 3% des PTCL-NOS (65).

2. *Diagnostic*

a) *Histologie et morphologie*

L'examen histologique des biopsies retrouve généralement un mélange de petites et grandes cellules atypiques (13,14). Il est fréquemment retrouvé des cellules à cytoplasme clair, une éosinophilie et une augmentation de la vascularisation (13,14). Plusieurs variants ont été décrits au cours des dernières décennies selon les caractéristiques morphologiques (13,14). Alors que certains ont été reclassés dans d'autres groupes, le variant lymphoépithélioïde composé de nombreux histiocytes épithélioïdes et de petites cellules T CD8⁺ cytotoxique, représente une forme rare de PTCL-NOS (14).

b) *Immunohistochimie*

Les cellules tumorales expriment le plus souvent un TCR $\alpha\beta$ (69). Elles sont le plus souvent CD3⁺ et CD2⁺ (65,66). Dans plus de la moitié des cas elles sont CD4⁺ plus rarement CD8⁺ (moins de 20% des cas) et peuvent aussi être doubles positives ou avoir perdu l'expression de ces 2 marqueurs (65,66). Tout comme les AITL les cellules tumorales peuvent également perdre l'expression d'un ou plusieurs marqueurs pan-T (69). Ainsi il existe une perte fréquente du CD7 ou moins fréquemment du CD5, CD3 et/ou CD2 (13,69). Les PTCL de type CD8⁺ semblent souvent présenter un profil cytotoxique avec une expression de granzyme B (GZMB) et de la protéine de liaison à l'ARN associée aux granules cytotoxiques (TIA-1). Mais cela peut varier selon les séries et avec l'évolution de la compréhension et donc de la classification des PTCL-NOS (69).

Concernant le CD30, les cellules tumorales peuvent l'exprimer dans environ 17 à 30% des cas (65,66).

La présence de cellules infectées par EBV est moins fréquente que dans les AITL mais peut représenter jusqu'à 50% des cas (14,71).

c) Cytogénétique

Les anomalies cytogénétiques décrites dans la littérature sont différentes de celles décrites dans les AITL (13). Par puce d'hybridation génomique comparative (CGH) les anomalies récurrentes les plus fréquemment observées sont des gains 7q, 8q, 17q, 22q, 1q, 3p, 5p, 16p, 3p, 11q et des pertes récurrentes dans plusieurs chromosomes, dont 6q et 10p, 10q, 12q, 9p, 13q, 5q (13,46). Les caryotypes complexes sont plus fréquents dans les PTCL-NOS que les AITL (13,46).

d) Biologie moléculaire

Les mutations *TET2* représentent 8 cas sur 34 (22%) au sein de la cohorte du consortium TENOMIC (53). Des mutations *DNMT3* et *RHOA^{G17V}* peuvent également être retrouvées, quoiqu'à une plus faible incidence que dans les AITL (52,55,56).

e) Profil d'expression génique

Afin de mieux comprendre ce groupe, des études transcriptomiques ont été effectuées (13,34,72–74). Sur le plan moléculaire, il s'agit également d'un groupe très hétérogène, bien distinct des AITL (13,34). Les LT tumoraux diffèrent des LT normaux activés par une dérégulation des gènes liée à la prolifération, à l'apoptose, à l'adhésion cellulaire et au remodelage de la matrice (13,74).

Plusieurs groupes ont essayé de séparer les PTCL-NOS en fonction de leur profil génétique.

Ainsi l'étude de 109 gènes de la voie Nuclear Factor of the κ -chain in B-cells (NF- κ B) (impliqués dans la prolifération et la survie des lymphocytes T) dans une cohorte du groupe coopérateur espagnol des lymphomes T, a permis de séparer les PTCL NOS en 2 groupes (72). Le premier avec une augmentation de l'expression de ces gènes et le deuxième avec une réduction, par rapport au ganglion réactionnel contrôle.

Les travaux de Ballester et al., eux, proposent une séparation en 3 sous-groupes en fonction de leur profil (73) : le premier comprenant une signature des gènes le plus souvent associés à un mauvais pronostic dans d'autres tumeurs, telles que *CCND2* ; Le 2^{ème} associé à une surexpression des gènes impliqués dans l'activation des lymphocytes T et l'apoptose, y compris *NFKB1* et *BCL-2* ; Le 3^{ème} associé à une surexpression des gènes impliqués dans la voie Interféron (IFN)/JAK/STAT.

Le travail de Iqbal J. et al. sur 121 cas de PTCL-NOS a permis de définir 3 grands groupes majeurs avec une différence significative de leur survie globale (SG) ($p = 0.03$) (75,76). Le premier groupe montrait une forte expression de GATA3 et de ces gènes cibles connus (Chemokine (C-C motif) receptor (*CCR*) 4, *IL18RA*, *CXCR7*, *IK*) (75,76). Il s'agissait d'une signature liée aux lymphocytes Th2. Le second groupe montrait une plus forte expression de T-box Transcription Factor 21 (TBX21) et d'Eomesodermine (EOMES) et de leurs gènes cibles (*CXCR3*, *IL2RB*, *CCL3*, *IFN γ*) (75,76). Cette signature était liée aux lymphocytes Th1. Et enfin le troisième groupe montrait également une plus forte expression de TBX21 sans hyper expression d'EOMES, mais associée à une hyper expression de transcrits liés aux LT CD8⁺ cytotoxique (75,76).

Il est intéressant de noter que les PTCL-NOS CD30⁺ et PTCL-NOS CD30⁻ ont un profil moléculaire distinct (34).

D. Facteurs pronostiques dans les PTCL

1. *Stade et imagerie*

Après le diagnostic les examens complémentaires ont pour objectif l'évaluation du stade et du pronostic de la maladie. Cependant les PTCL se présentent plus sous des formes disséminées (stade III ou IV d'Ann Arbor) conférant une valeur prédictive moins performante à cette classification que dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (3,6,65,67). Certaines études rapportent qu'un volume tumoral important ($\geq 10\text{cm}$) semble conserver un impact indépendant dans les PTCL-NOS vis-à-vis du score de l'index pronostique international (IPI) sur la SG (65).

La technique d'imagerie de choix à l'heure actuelle est la Tomographie par Emission de Positons (TEP) au 18F-Fluoro-deoxyglucose (FDG) couplée au scanner. Néanmoins, bien que sa valeur pronostique au diagnostic et en fin de traitement semble confirmée dans les différentes études, celle en cours de traitement reste débattue (77–80).

Certains éléments sanguins au diagnostic impactent le pronostic des patients : monocytes élevés ; thrombocytopénie ; Immunoglobuline (Ig) A élevée ; hypo albuminémie ; élévation de la $\beta 2$ microglobuline (81,82).

2. *Caractéristiques tumorales*

Les éléments anatomopathologiques peuvent apporter des informations pronostiques. Ainsi au niveau morphologique, dans les PTCL-NOS, le variant lymphoépithéliode semble être associé à un meilleur pronostic global (14,65).

L'analyse des PTCL-NOS du projet international des lymphomes T a identifié en univarié, mais pas en multivarié avec l'IPI, une expression du Ki67 (>25% des cellules tumorales), de CD56 (>20% des cellules tumorales) ou de CD30 (>20% des cellules tumorales) comme prédicteurs défavorables de la SG (65). L'impact du Ki67 (>30% des cellules tumorales) était également retrouvé dans l'analyse de la cohorte AILT de ce même projet (7). Le CD15 pourrait avoir été associé à un meilleur pronostic, mais cela reste à confirmer (69). L'infiltration par des macrophages immunosuppresseurs CD163⁺ peut favoriser la progression et est corrélée à un mauvais pronostic (17,83,84). Le statut EBV positif confère un impact péjoratif dans plusieurs études (65,69,71). La valeur pronostique des altérations cytogénétiques est encore débattue (46,85).

Au niveau moléculaire, la présence de mutations de l'épigénétique, de *RHOA* ou de *TP53* semble impacter négativement la survie des patients présentant un AITL (86,87).

Concernant la signature d'expression génique et/ou protéique, dans les PTCL-NOS un profil cytotoxique ou une surexpression de *GATA3* sont associés à un plus mauvais pronostic alors qu'une surexpression de *TBX21* en l'absence de profil cytotoxique semble associée à un meilleur pronostic (75,76,88). De même une surexpression de la voie NF-κB est corrélée à de meilleurs résultats dans les PTCL et une signature de type « prolifératif » est corrélée à un plus mauvais pronostic dans les PTCL-NOS et AITL (13,72,73). D'autres signatures semblent impacter les réponses au traitement telle que l'ARNm du *CYP3A4* (89).

3. *IPI et autres scores pronostiques clinico-biologiques*

En 1993, l'IPI a été établi en tant que score pronostique préthérapeutique dans les LNH agressifs (90). Il prend en compte le stade Ann Arbor, la présence d'atteintes extra-ganglionnaires, le taux de LDH, l'âge (inférieur vs supérieur ou égal à 60ans), et le PS, identifiés au préalable comme facteurs pronostiques (90). Il permet de séparer les patients en 4 groupes de pronostics différents en fonction du nombre de facteur : risque faible (0 ou 1 facteur) ; risque intermédiaire faible (2 facteurs) ; risque intermédiaire élevé (3 facteurs) ; risque élevé (4 ou 5 facteurs) (90). L'International Lymphoma Study Group (ILSG) montre en 1997 que la SG et la survie sans progression (SSP) sont significativement meilleures pour les patients présentant un risque faible par rapport à un risque élevé selon l'IPI (91). Ces résultats étaient confirmés dans la cohorte des PTCL-NOS de l'International Peripheral-T cell Lymphoma Project et dans d'autres cohortes (65,66,92).

L'intergroupe italien du lymphome propose l'utilisation d'un index pronostic spécifique pour les PTCL-NOS (PIT) d'après leur travail portant sur une étude rétrospective de 385 PTCL-NOS (67).

Ce score comprend l'atteinte de la moëlle osseuse, l'âge, le PS et le taux de LDH. Cependant sa supériorité par rapport à l'IPI est débattue (65,67,69).

De même, l'équipe de Federico M. et al., a établi que l'IPI n'était pas un bon score pronostique pour les AITL et propose un autre score : le PIAI (7). Il prend en compte l'âge, le PS, le nombre d'atteinte extra-nodale, la présence de symptôme B et d'une thrombopénie (7). Il était plus performant au sein de la cohorte des 243 AITL de l'International Peripheral-T cell Lymphoma Project (7). Nous avons notamment utilisé ce score pour établir la valeur pronostic de CD39 au cours de mes travaux.

E. Traitements

1. *Le traitement de référence en première ligne : CHOP*

La majorité des patients présentant un PTCL (>70%) sont traités par chimiothérapie à base d'anthracycline (7,11,65). La polychimiothérapie par cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prédisonne (CHOP) représente ainsi le traitement de référence en première ligne dans la majorité des PTCL à l'exception notable des lymphomes anaplasiques. Cependant les résultats sont non satisfaisants, avec des taux de réponse complète variant entre 40 et 70%, et des SG à 5 ans relativement similaire entre PTCL-NOS et AITL, variants entre 25 et 35% en fonction des essais cliniques (3,6,9,11,65,66,92). Au sein des PTCL nodaux seuls les ALCL ALK positifs présentent une meilleure SG (70% à 5 ans).

Lors des tentatives d'intensification des cures de CHOP d'induction, seul l'ajout d'Etoposide semble faire significativement mieux chez les patients de moins de 60 ans atteint de PTCL sur la SSP mais sans impacter la SG (92). Cependant ce bénéfice n'a jamais été prouvé en analyse en sous-groupe dans les AITL et PTCL-NOS, mais seulement dans les ALCL (93). L'ajout de radiothérapie n'améliore pas significativement la SG et la SSP (92).

2. *Place de l'autogreffe et de l'allogreffe*

L'intensification par autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ASCT) ou allogreffe en première ligne est très controversée et ne semble pas être la stratégie adéquate (92,94–97).

Concernant la première rechute ou progression, le délai médian avec le diagnostic initial est d'environ 7 mois (98). La SG et la SSP de ces patients sont désastreuses, en l'absence de greffe de cellules souches hématopoïétiques avec une SG médiane de 5.5 mois (98). L'ASCT en consolidation d'un traitement de rattrapage ne présente néanmoins pas de résultats suffisants (99,100). En revanche, il a été observé un effet anti tumoral à médiation immunitaire, du greffon contre le lymphome lors

d'allogreffe dans des contextes d'absence de sensibilité à la chimiothérapie (101,102). La SG à 5 ans dans le cadre de PTCL en rechute ou réfractaire (R/R) traité par allogreffe est d'environ 50 à 60% (102,103). Chez les patients jeunes l'objectif est donc l'obtention d'un contrôle de la maladie en vue de réaliser une allogreffe.

Il est, de ce fait, important, alors que de nouvelles drogues aux mécanismes novateurs se développent, d'identifier les meilleures stratégies de contrôle de la maladie (104). Il n'est pas clair notamment que l'utilisation de schéma combiné avec plusieurs drogues de chimiothérapie, dans le cadre de maladie en R/R, soit plus efficace que les stratégies en monothérapie ou les stratégies à bases d'immunothérapie et autres thérapies innovantes, avec en outre un risque d'effets indésirables plus importants.

3. Immunothérapie dans les PTCL

Au-delà de ces thérapies « historiques », une série de traitements novateurs ont été testés ou sont en cours de développement dans les PTCL dont les immunothérapies. Nous en discuterons plus en détails dans la suite du manuscrit.

4. Autres modalités thérapeutiques et perspectives

La meilleure compréhension du développement oncogénique des PTCL et notamment des AITL et le développement des modèles précliniques conduit au développement d'autres stratégies thérapeutiques (104). Tout d'abord avec les modulateurs épigénétiques, tels que les inhibiteurs d'histone deacetylase (HDACi), ou les inhibiteurs d'ADN méthyltransférases comme la 5-azacytidine et le guadecitabine (105–109). Ensuite les inhibiteurs d'EZH et IDH, donnent des résultats prometteurs (110). Enfin le ciblage des voies PI3K/AKT/mTOR et JAK/STAT est également étudié (111–115). Cependant leurs résultats sont encore limités aux patients en R/R et ne semblent pas apporter de bénéfice au CHOP de première ligne. Ainsi l'ajout de Romidepsine (HDACi) au CHOP n'a pas amélioré la SSP et la SG des patients mais semble néanmoins en analyse de sous-groupe améliorer le pronostic des AITL (107).

Des études laissent entrevoir d'autres cibles potentielles, telle que la voie NF-kB (72,73). De même le profil d'expression génique a identifié une surexpression de PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor alpha) dans les PTCL-NOS, confirmée en IHC (74). Cela pourrait avoir des implications thérapeutiques compte tenu de la sensibilité potentielle de cette tyrosine kinase à l'imatinib.

Les caractéristiques phénotypiques et oncogéniques des PTCL-TFH et leurs stratégies thérapeutiques sont résumées dans la figure 2 (104).

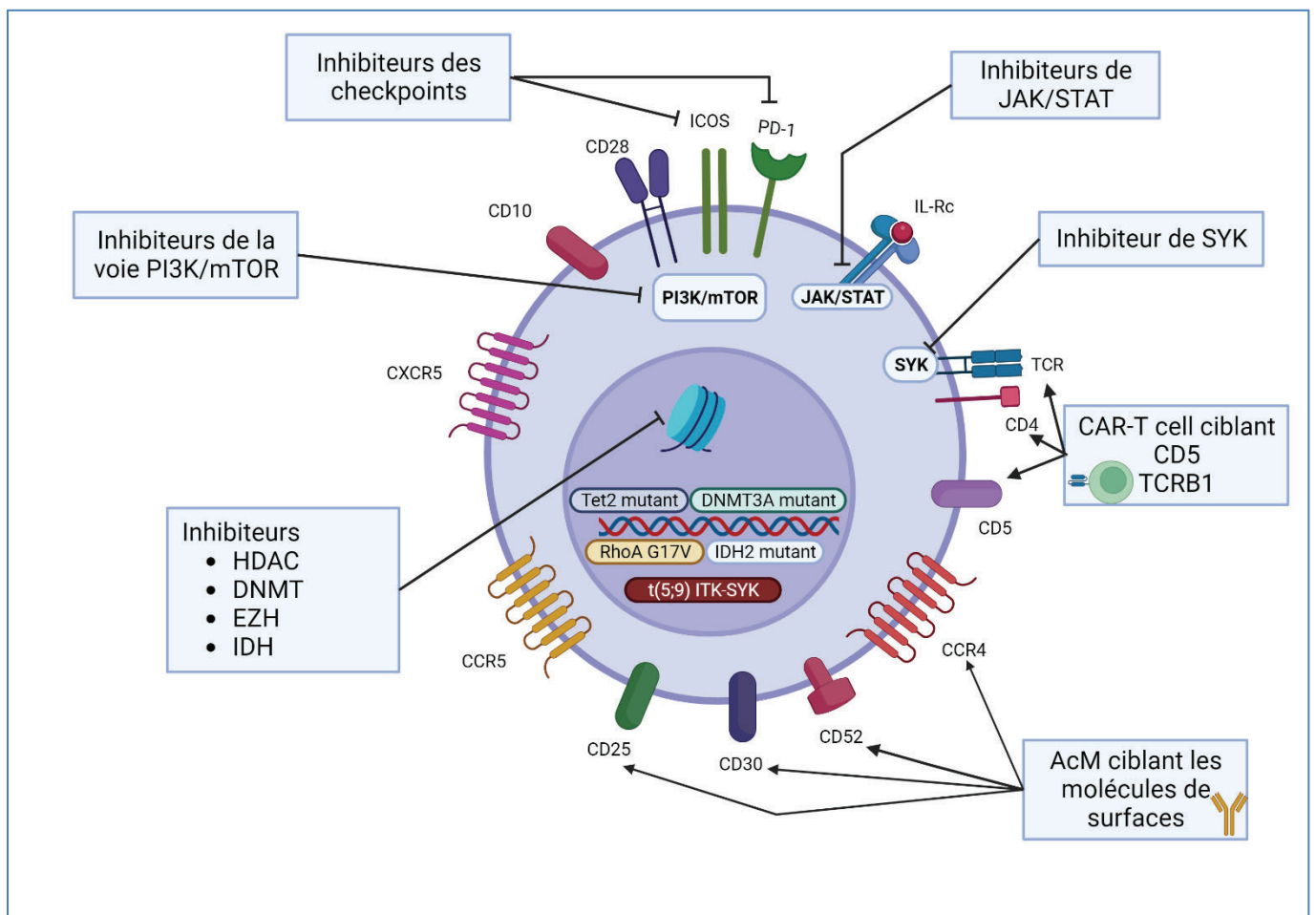


Figure 2. Caractéristiques phénotypiques, aberrations génétiques et stratégies thérapeutiques potentielles des PTCL-TFH. (D'après Du J. et al., *Front Oncol* 2023 (104)). Figure réalisée avec BioRender.com. Abréviations : CD, cluster de différenciation ; TCR, récepteur cellules T ; CCR, chemokine receptor ; PD-1, Programmed cell death protein 1 ; ICOS, Inducible T-cell COStimulator ; IL-Rc, Interleukin receptor ; PI3K, phosphoinositide 3-kinase ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; JAK, Janus kinase ; SYK, spleen tyrosine kinase ; STAT, signal transducer and activator of transcription ; HDAC, histone deacetylase ; DNMT, DNA methyltransferase ; EZH, enhancer of zeste homolog ; IDH, isocitrate dehydrogenase ; AcM, Anticorp monoclonal ; CAR, chimeric antigen receptor.

Depuis la mise en place du CHOP, le traitement de 1^{ère} ligne des PTCL n'a pas été amélioré et ce malgré une compréhension biologique toujours plus grande. Des progrès prometteurs ont été réalisés pour les patients en R/R, mais qui restent encore limités. La compréhension du rôle de l'immunité dans le cancer a permis le développement des immunothérapies qui ont révolutionné le traitement dans certaines tumeurs solides et dans certains lymphomes. Cependant les PTCL semblent encore inaccessibles à ces traitements innovants, certes les Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-cells sont à l'étude et certains anticorps monoclonaux (AcM) montrent des bénéfices, mais en tant que LT la cellule tumorale des PTCL pose problème. Que ce soit en termes de facteurs pronostiques qui ne permettent pas à l'heure actuelle de changement thérapeutique, ou des résultats moléculaires et IHC

qui n'ont pas identifié de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes hormis le Brentuximab Vedotin, le besoin de toujours mieux comprendre les PTCL NOS et AITL qui sont les PTCL les plus fréquents en Occident est indéniable.

II. IMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE DANS LE CANCER

L'une des fonctions reconnues du système immunitaire est l'immunosurveillance antitumorale, consistant en la reconnaissance de signaux de dangers et antigènes associés à la transformation des cellules tumorales, et leur éradication (116). Ainsi chez la souris la lymphopénie, par irradiation par exemple, empêche le rejet tumoral et chez l'homme les contextes d'immunosuppression (virus d'immunodéficience humaine (VIH), traitement immunosuppresseurs), sont propices au développement de cancer (117,118). Néanmoins, les cancers peuvent se développer chez les personnes immunocompétentes, nécessitant ainsi l'échappement au contrôle immunitaire. En effet, les cellules tumorales peuvent tromper et affaiblir le système immunitaire en allant jusqu'à l'utiliser pour se façonner un microenvironnement favorable, dit immunosuppresseur.

La compréhension du fonctionnement « physiologique » du système immunitaire et de celui des cancers a permis le développement de traitement visant à restaurer l'immunité antitumorale : les immunothérapies.

A. Immunité innée et cancer

L'immunité innée est caractérisée par une mise en place rapide et immédiate en cas d'agression par un agent pathogène (119). De nombreuses évidences ont désormais établi qu'il s'agit également d'un mécanisme actif dans le cancer (119). Ce type de réponse est relativement peu spécifique, c'est-à-dire qu'elle ne dépend pas d'une restriction antigénique. Elle repose notamment sur la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPS) ou au danger (DAMPS) par des récepteurs reconnaissant des structures moléculaires (PRR), tels que les récepteurs TOLL (TLR) (119). Les cellules de l'immunité innée ont une action de lutte directe contre l'agent pathogène mais également d'orchestration de la réponse immunitaire par initiation de l'inflammation, du recrutement d'autres cellules immunitaires par l'intermédiaire des cytokines et chimiokines qu'elles sécrètent, et de présentation des antigènes (119). De par ces fonctions multiples, les cellules de l'immunité innée

jouent des rôles qui peuvent être pro ou anti-tumoraux. Nous allons maintenant aborder certains des types cellulaires que j'ai étudiés au cours de ma thèse.

1. *Macrophages*

a) *Fonctions dans le cancer*

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont la principale population phagocytaires infiltrant la tumeur (120,121). Cependant ils sont généralement associés à un pronostic sombre dans les tumeurs solides (120–122). En effet en règle générale, ils représentent l'une des principales populations immunosuppressives, et suppriment les réponses aux traitements standards et aux immunothérapies (120,121). Ils présentent alors une capacité limitée à activer ou à restimuler les LT CD8⁺ (123). Il s'agit en fait d'un groupe cellulaire hétérogène avec des fonctions diverses, et historiquement séparé en 2 catégories : M1 et M2, bien qu'il s'agisse plutôt d'un continuum et que cette classification soit donc remise en cause (120,121).

D'un côté les macrophages « M1 » proviennent d'une polarisation « classique » par l'activation d'un TLR et l'IFN γ . Ceci conduit à l'expression de taux élevés de cytokines inflammatoires, de CMH-II et de molécules costimulatrices CD80 et CD86 (124,125). Ces fonctions permettent une activité anti-tumorale. De l'autre côté les macrophages dits « M2 » polarisés en présence d'IL-4 notamment, sont plutôt anti-inflammatoires et pro-tumorigènes. Ils peuvent inhiber directement les réponses des LT cytotoxiques par 3 mécanismes :

- l'engagement des points de contrôle immunitaires via l'expression de leur ligand observé dans plusieurs cancers (126).
- La production de cytokines inhibitrices : IL-10, Transforming growth factor (TGF) β (127,128).
- Leur activité métabolique (expression de l'arginase) (129).
- Ceci leur permet d'inhiber les réponses T, via notamment le recrutement de populations immunosuppressives (Treg...) et l'inhibition de l'activation des LT effecteurs (120,128,130).

b) *Ciblage thérapeutique des Macrophages*

Il existe donc un intérêt à cibler les TAM afin de réduire leur nombre ou de les orienter vers un profil M1 antitumoral. Ceci peut être fait par exemple en inhibant leur recrutement vers le site tumoral. Ainsi l'inhibition de l'axe CCL2/CCR2 maintient les monocytes dans la moelle osseuse réduisant les TAM (131–133). Dans les modèles précliniques le blocage de CCL2 ou CCR2 peut améliorer

l'efficacité de la chimiothérapie, de la radiothérapie et de l'immunothérapie (131,134,135). Plusieurs essais sont en cours et une étude de phase précoce dans le cancer du pancréas a montré une augmentation de plus de 40% de la réponse à la chimiothérapie lorsque les inhibiteurs du CCR2 y étaient combinés (131). Une autre option est l'inhibition de la signalisation du Colony Stimulating Factor (CSF) 1 et de son récepteur (CSF1R) qui entraîne la mort apoptotique d'une partie importante des TAM (136,137). Son inhibition dans les modèles d'animaux améliore les réponses des LT en combinaison avec la radiothérapie, la chimiothérapie ou avec des immunothérapies, y compris les agonistes de CD40 et les antagonistes de PD-1 et CTLA-4 (138–141). Plusieurs essais cliniques sont en cours (142).

La reprogrammation des TAM dans leur activité anti-tumorale est également une stratégie attrayante, bien qu'encore peu développée. L'une des approches est l'utilisation d'anticorps agonistes de CD40 qui semble permettre l'acquisition d'un profil M1 (143–146). L'activation des TLR, par exemple grâce à une vaccination BCG, semble être prometteuse dans le cancer de la vessie, via un mécanisme médié par les macrophages (147). Chez la souris l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC induit un phénotype antitumoral des macrophages et augmente la réponse à la chimiothérapie et aux inhibiteurs de checkpoint (148). D'autres traitements tels que les inhibiteurs de PI3K entraînent la reprogrammation des macrophages et leur soutien à la réponse antitumorale dans les modèles précliniques (149–153). L'utilisation de ARNm ou de microARN est également à l'étude (154–156).

Enfin d'autres techniques sont en cours d'étude, telle que l'utilisation d'anticorps bispécifiques Angiopoïétin 2 (ANG2)- Vascular endothelial growth factor (VEGF) dans le but de lever la résistance par l'angiopoïétine 2 des cellules myéloïdes sur les anti VEGF, avec des résultats intéressants dans des modèles précliniques de glioblastome (157,158). L'utilisation de cellules CAR-T dirigées contre les TAM à activité immunosuppressive, a permis *in vitro* d'éliminer sélectivement ces TAM, entraînant le recrutement de monocytes pro-inflammatoires et de LT CD8⁺ (159). L'utilisation directe de macrophages est très attrayant, comme transporteurs de cytokines telle que l'IFN α , avec un essai clinique en cours dans le glioblastome ou armés de récepteurs reconnaissant des cibles tumorales (CAR-M) (160).

2. DC

a) Impact dans le cancer

Les cellules dendritiques sont des acteurs clés des réponses immunitaires, notamment dans le cadre du cancer (119). Ceci est particulièrement dû à leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles (119). Elles sont capables de présenter des antigènes à la fois sur

le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II et disposent de nombreuses molécules de co-stimulation, leur permettant d'activer efficacement et d'orienter la différenciation des lymphocytes T. De ce fait une réduction des DC peut conduire à une progression tumorale telle que dans le cancer du pancréas (161).

Cependant tout comme les macrophages, il s'agit d'un groupe hétérogène composé de différents sous-ensembles : plasmacytoïdes (pDC), conventionnelles (cDC) de type 1 et de type 2, et monocytaire (moDC) (162). Ainsi certaines DC peuvent améliorer la surveillance tumorale ; notamment les cDC1, qui semblent être la sous-population la plus apte à cross-présenter des antigènes exogènes sur le CMH-I. Chez les souris déficientes en BATF3, FT contrôlant la polarisation en cDC1, la capacité de rejet des tumeurs immunogènes transplantées et la réponse de leur LT à l'immunothérapie antitumorale est détériorée (123,163–165). Chez l'homme, une densité accrue en cDC1 dans le microenvironnement tumoral semble être associée à un meilleur pronostic et une meilleure réponse aux anti-PD-1 (123,166,167).

A l'inverse, de nombreuses pDC infiltrent les tumeurs mais ils ne répondent pas à la stimulation TLR et ne produisent que peu d'IFN α . De plus ils peuvent recruter les Tregs et sécréter des molécules immunosuppressives (168,169). Ils jouent ainsi un rôle important dans la progression du cancer de l'ovaire via l'induction de la tolérance immunitaire et dans le mélanome (170,171).

Les moDC peuvent remplir des fonctions à la fois pro-inflammatoires et de tolérance (172,173). Leur présence est associée à des réponses aux anti-PD-1 seuls et en thérapie combinée (174).

b) Ciblage des DC

Du point de vue thérapeutique, la mobilisation et l'activation des DC, pour améliorer la réponse antitumorale T, sont attrayantes. C'est par exemple l'un des mécanismes d'action du Talimogene Laherparepvec, virus oncolytique permettant une surexpression du GM-CSF (175). Or le GM-CSF stimule directement la différenciation, l'activation et la migration des DC. Chez la souris l'administration de ligand de FLT3, molécule participant à la production de DC, améliore l'activation des LT CD8⁺ et le contrôle des tumeurs (163,176). Des essais cliniques sont actuellement en cours chez l'homme. De même la stimulation des TLR est une stratégie efficace avec, comme discuté précédemment, le BCG dans le cancer vésical qui conduit à une activation accrue des DC (177). Les agonistes de TLR3 tel que le poly(I :C) induisent l'activation des DC et améliorent leur activité antitumorale aboutissant à une suppression thérapeutique des cancers dans des modèles précliniques (163,165,178). Enfin l'Imiquimod, ligand des TLR7/8, favorisant la cytotoxicité médiée par les pDC,

a été approuvé comme traitement local des cancers de la peau, et de nombreux essais cliniques sont en cours (179).

Les vaccins à base de DC ont également présenté des résultats prometteurs dans les essais cliniques de phase I dans le glioblastome (180–182). De même les résultats des essais précoces dans la leucémie aiguë myéloblastique (LAM) (183,184), dans le cancer du sein (185), et le mélanome (186) semblent prometteur. Dans un essai de phase III le vaccin à base de DC a amélioré la SG dans le cancer colorectal (187).

3. Cellules NK

a) Impact dans le cancer

Chez la souris les cellules NK se caractérisent par l'absence de CD3 et la présence de NK1.1 et chez l'homme par l'absence de CD3 et la présence de CD56 (188). Elles représentent entre 5 et 15% des lymphocytes circulants et se divisent en 2 catégories selon le niveau d'expression de CD56 et l'expression de CD16 (189,190) :

- CD56^{faible}CD16⁺ : forte cytotoxicité
- CD56^{haut}CD16^{faible/-} : forte expression de cytokines inflammatoires telles que l'IFN γ

Le rôle bénéfique des NK dans l'immunosurveillance a été documenté dans les modèles murins (191–195) et est suggéré chez l'homme par la corrélation entre apparition de tumeur maligne et immunodéficiência primaire des NK (196–198). Elles sont capables d'attaquer directement les cellules tumorales par leur granules cytotoxiques et via les récepteurs de mort cellulaire tel que le ligand de (FasL) (199). Elles peuvent également agir indirectement par leurs fonctions immunomodulatrices via la sécrétion de chimiokines et cytokines telles que RANTES et IFN γ (166,200). Une faible infiltration par les NK et une diminution de leur fonction dans les tissus tumoraux semble être de mauvais pronostic (201,202). A l'inverse des cellules T, l'activité des NK n'est pas restreinte par la spécificité antigénique, faisant de ces cellules d'excellents outils d'immunothérapie.

b) NK et immunothérapies

L'état d'activation des cellules NK est dicté par l'intégration et l'équilibre des signaux d'activation (nommés KAR) et d'inhibition (KIR) via des interactions ligand/récepteur (199). La compréhension de ce mécanisme, proche de celui des LT, est à l'origine des immunothérapies basées sur les NK. Initialement il a été montré que lors d'une allogreffe dans le cadre du traitement de la LAM, l'absence d'appariement sur les récepteurs KIR entraînait un effet Graft versus Leukemia

(GVL) sans entrainer de Graft Versus Host (GVH) (203,204). Dans des modèles murins précliniques xénogreffés de cancer de l'ovaire, entre autres, le transfert adoptif de NK a montré une activité antitumorale (205). De même le transfert de cellules NK alloréactives a montré des réponses cliniques dans le cadre de LAM, de lymphome réfractaire et de myélome multiple avancé en dehors d'allogreffe (188,206–208). Cependant l'efficacité clinique reste encore limitée.

Une des solutions à l'étude en préclinique est l'utilisation de NK génétiquement modifiées exprimant un CAR ciblant les hémopathies et les tumeurs solides. Ainsi des essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'innocuité et l'efficacité, avec notamment des essais de phase I/II de CAR NK ciblant le CD19 dans les hémopathies CD19⁺ en rechutes ou réfractaires (NTC03056339). Les résultats préliminaires ont montré une réponse objective chez 8 patients sur 11 dont 4 réponses complètes (209). De même des essais cliniques sont en cours dans les cancers solides avec par exemple des CAR NK ciblant le human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) (NTC04319757).

Une autre méthode est la confection d'anticorps bi ou tri-spécifiques ciblant à la fois un récepteur des NK (p.e CD16) et un antigène tumoral (210). Un essai clinique, dans les hémopathies malignes de haut risque, est en cours pour le GTB-3550, anticorps tri-spécifiques ciblant le CD16, le CD33 avec incorporation de l'IL15 (211). Enfin, le ciblage de récepteurs inhibiteurs des NK, telles que NKG2A, semble prometteur dans de nombreux types de cancer (212).

D'autres stratégies consistent à améliorer les fonctions des NK, par notamment l'utilisation de cytokines telles que l'IL-15 avec l'ALT-803, complexe de fusion IL-15/IL-15Ra (213). Son injection associée à une perfusion de cellules NK a considérablement amélioré les effets de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) des NK dans un modèle murin de lymphome B (213).

B. Immunité adaptative et cancer

Il s'agit d'une ligne de défense moins rapide (1 à 2 semaines), mais plus spécifique car restreinte à la reconnaissance de structures ou peptides spécifiques. 2 grands types cellulaires constituent l'immunité adaptative : les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T.

1. *Lymphocytes B et immunité humorale*

Les LB, qui se différencient dans la moelle osseuse, se caractérisent par leur récepteur de surface, appelé récepteur des cellules B (BCR) (214). Cette Ig peut être membranaire ou soluble (anticorps (Ac)) participant à la réponse immunitaire tumorale (214). L'activation des LB repose avant tout sur l'engagement de leur BCR, associé aux co-récepteurs CD19, CD21 et CD81 (214). Ceci

permet l'engagement des voies MAPK, NF-kB et PI3K. En complément de ces signaux, les LB naïfs nécessitent un 2^{ème} signal, parfois donné directement par un constituant microbien et le récepteur Toll, mais dans la majorité des cas il est fourni par les cellules TFH via le récepteur costimulateur CD40, membre des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR), et par l'IL-21 (214). Cette interaction entraîne la formation des centres germinatifs, la maturation d'affinité des Ig et leur commutation de classe.

Le rôle de l'immunité humorale dans la réponse antitumorale est controversé (215,216). D'un côté, les LB peuvent jouer un rôle antitumorale, notamment par leur fonction de CPA. Ainsi ils peuvent participer, par leur production de molécule de costimulation et l'expression de CMH-II, à l'initiation d'une réponse antitumorale dans différents cancers (215). De même chez la souris il a été montré que certains LB activés par le CD40L, pouvaient initier une réponse immunitaire antitumorale spécifique et efficace (217,218). Ces résultats sont corroborés par l'impact pronostique favorable d'une forte infiltration par des LB et des plasmocytes dans certains types tumoraux, notamment présents au sein des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) (219,220).

Cependant d'un autre côté, les LB peuvent jouer un rôle pro tumoral. Dans des modèles de souris la présence des LB en phase initiale tumorale entraînait un défaut dans la cytotoxicité des LT (221). Ainsi des LB sont dit régulateurs (216). Ils sont capables de produire de l'IL-10, d'IL-35 et du TGF β (222). Grâce à ces cytokines ils inhibent les cellules pro inflammatoires, inhibant la prolifération et l'activation des LT effecteurs et également la production des cytokines pro inflammatoires par les autres cellules immunitaires (macrophages, DC, NK) (216). Ils peuvent également exprimer le ligand de Fas et induire l'apoptose des LT effecteurs ou encore provoquer l'anergie de ces LT en exprimant par exemple les ligands de PD-1 (223). Dans des modèles murins de cancer prostatique, des LB immunosuppresseifs, entraînant une résistance à l'oxaliplatine, exprimaient l'IL-10 et le ligand 1 de PD-1 (PD-L1) (223). De même ils peuvent limiter les fonctions effectrices antitumorales des LT CD8⁺ induites par la vaccination chez la souris (224).

2. *Lymphocytes T*

a) *Activation des LT*

Tout comme les LB, les LT sont caractérisés par l'expression d'un récepteur spécifique, le TCR (225,226). Le TCR est constitué d'un dimère de chaînes $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Il ne se lie pas de manière spécifique directement à un antigène mais à un complexe antigène peptidique-CMH.

Suite à leur différenciation dans le thymus, dans lequel ils subissent des étapes de sélection négative et positive, les LT quittent ce tissu et migrent dans la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes secondaires (225,226). Tant qu'ils n'ont pas rencontré leur Ag spécifique les LT matures sont dits « naïfs ». La rencontre de leur complexe peptide : CMH à la surface des CPA, dans les organes lymphoïdes secondaires, entraîne leur activation par les 2 premiers signaux et leur différenciation en LT effecteurs par un 3ème signal (225,226). Les cellules T effectrices ne nécessitent plus de second signal pour leur activation en cas de nouvelle rencontre avec leur Ag.

Afin d'être stabilisé à la surface, le TCR est associé au complexe protéique CD3 et à un homodimère de C (226). Par cette association chaque complexe du TCR contient 10 motifs ITAM (Tyrosine-based Activation Motif) intracytoplasmique. La liaison du TCR à son ligand, soutenue et amplifiée par la liaison du corécepteur CD4 ou CD8 au CMH, entraîne la phosphorylation de 2 résidus de tyrosine de chaque ITAM par la kinase LCK de la famille Src attachée aux domaines cytoplasmiques de CD4 et CD8 (226). La kinase CSK et la phosphatase CD45 régulent l'activité de LCK. C'est le déclenchement de la signalisation intracellulaire qui conduit au recrutement des protéines de signalisation telles que la kinase ZAP-70, puis de LAT et SLP-76 (226). Ceci permet :

- L'activation de la voie PI3K/ AKT, essentielle au métabolisme cellulaire
- L'activation de PLC γ qui, par génération de l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycerol (DAG), conduit à l'activation de 3 facteurs de transcription (227) : NFAT, NF-kB et AP-1
- L'activation de VAV qui, en activant les GTPase de la famille Rho, induit la polymérisation de l'actine et la réorganisation du cytosquelette essentielle à l'activation des LT

Cette signalisation induite par le TCR n'est pas suffisante pour activer un LT naïf. Un second signal est nécessaire par les récepteurs costimulateurs, principalement CD28 pour les LT (225,226). CD28 interagit avec ses ligands costimulateurs B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) présents sur les CPA entraînant la phosphorylation dans le domaine cytoplasmique de CD28, permettant de soutenir l'activation de PI3K et NF-kB (225,226).

Enfin, le troisième signal provient de cytokines, qui par activation de voies JAK/STAT notamment, permettent d'orienter la différenciation du LT. Certains membres de la superfamille des TNFR et CD28 (CD40, OX40, 4-1BB, CD30, CD27, ICOS...) ont également un rôle de co-stimulateurs lors de liaison à leur ligand (226). On notera que la chronicité de cette stimulation peut conduire à un phénotype d'épuisement, qui sera abordé en détail par la suite (228).

b) Les LT CD4⁺ conventionnels

Les LT CD4⁺ jouent divers rôles dans les réponses immunitaires et l'homéostasie tissulaire (229). Cette variété fonctionnelle repose sur l'existence de nombreux sous-types de LT CD4⁺ de types « auxiliaires » (helper) (Th) et régulateurs ayant notamment des fonctions et impacts pronostiques différents dans le cancer (229). Bien que les LT CD8⁺ aient longtemps été considérées comme les acteurs privilégiés de l'immunité anti-tumorale, on assiste actuellement à un rebond de l'intérêt pour les CD4⁺ (229). Un élément argumentant leur rôle dans le cancer est la valeur de bon pronostic de l'expression des molécules de CMH-II (230). Or, hormis dans les conditions de présentations croisées, le CMH-II est reconnu par les LT CD4⁺.

(1) Th1

La polarisation en Th1 est induite par la signalisation du récepteur à l'IL-12, qui active la voie JAK2-STAT4 (231). Cette signalisation va permettre l'expression de leur FT spécifique : T-box expressed in T cells (T-bet), et la production d'IFN γ , de TNF et d'IL-2 en grande quantité (231).

Les LT Th1 jouent un rôle clé contre les pathogènes intracellulaires et les réponses antitumorales, via le recrutement et l'activation d'autres cellules « pro-inflammatoires » (macrophages M1, LT CD8⁺, cellules NK) et une activité cytotoxique directe par la production de ligand de Fas et de lymphotoxine β (232,233). Par ces capacités, leur présence dans le microenvironnement tumoral confère un meilleur pronostic (234,235). Dans les modèles murins de cancer, il a été observé une action antitumorale synergique lors du co-transfert adoptif de LT Th1 et CD8⁺ conduisant au rejet des tumeurs (236).

(2) Th2

La polarisation en Th2 est induite par l'IL-4 qui va entraîner l'activation de STAT6, permettant l'expression du FT spécifique des Th2 : GATA3 (237,238). Les LT Th2 recrutent et activent, par la production d'IL-4, IL-13, IL-5, IL-3 et IL-9 et du ligand de CD40, les macrophages M2 (par activation alternative), les éosinophiles, les mastocytes, les NK (239). Ils favorisent également l'activation et la commutation de classe des Ig produites par les LB en IgE et l'armement des mastocytes par ces IgE. Par l'ensemble de ces fonctions ils jouent un rôle clé dans le contrôle des infections par les parasites extracellulaire, tels que les helminthes, dans les expositions aux venins et dans la réparation des tissus endommagés (239).

Leur rôle dans les cancers est incertain et débattu. En effet d'un côté par leur recrutement et l'activation des macrophages M2 et de LB pro tumoraux ils favorisent les fonctions pro-inflammatoires

du microenvironnement tumoral (TME) (240). Cependant ils semblent également pouvoir participer aux fonctions antitumorales dans des modèles de transfert chez la souris et dans des modèles de cancer du sein (241–244). Ainsi leur valeur pronostique diffère chez l'homme d'un cancer à l'autre (241,245,246).

(3) Th9

La polarisation en Th9 peut être induite *in vitro* par l'IL-4 et le TGF β qui vont entraîner, comme pour la polarisation Th2, l'activation de STAT6, favorisant l'expression de GATA3 mais à contrario également de PU.1 (247). Les LT Th9 se caractérisent par la production IL-9. Tout comme leur programme transcriptionnel semble étroitement lié au profil Th2, leur fonction principale semble proche. En effet ils participent essentiellement aux réponses antiparasitaires.

Ils semblent également remplir un rôle important dans l'immunité antitumorale (248,249). Alors que leur potentiel antitumoral chez la souris semble certain, par notamment leur activité cytotoxique directe, leur valeur pronostique chez l'homme reste encore débattue (250,251).

(4) Th17

La polarisation en Th17 est classiquement induite par l'IL-6 et le TGF β qui vont conduire à l'activation de STAT3 entraînant l'expression du FT spécifique : ROR γ t (252,253). D'autres FT entrent probablement en jeu tels que IRF4 ou ROR α mais leur rôle et leur importance ne sont pas encore clairement identifiés (254,255). En revanche en cas de stress, tel que l'inflammation, le TGF β n'est plus nécessaire à la polarisation en Th17 (256). Les LT Th17 tirent leur nom de leur production d'IL-17. Leur concentration est importante dans les tissus constituant les barrières physiques de l'immunité. En coopération avec l'IL-22 également produite par les Th17, l'IL-17 participe à l'immunité de ces barrières épithéliales contre les pathogènes extracellulaires (bactériennes et fongiques) et à l'homéostasie des tissus en activant les cellules épithéliales et stromales locales (257,258). Outre cette activation locale qui entraîne une élimination directe des agents pathogènes par inhibition de la croissance et de la colonisation bactérienne et la réparation tissulaire, ces cytokines associées au ligand du CD40 recrutent et activent des neutrophiles.

Leur activité dans le cancer est à ce jour controversée. En effet les LT Th17 présentent des actions antipodes, d'une part ils peuvent agir positivement sur les cellules cancéreuses (survie, prolifération, invasion) (259,260) et le recrutement des cellules immunosuppressives et d'autre part ils peuvent également agir positivement sur le recrutement et l'activation des cellules antitumorales (LT,

NK, DC et macrophages) (261,262). Ainsi leur valeur pronostique diffère d'un cancer à l'autre (263–266).

(5) TFH

Les cytokines impliquées dans la polarisation en TFH sont encore mal connues, bien que l'IL-6 et l'IL-21 permettent leur polarisation *in vitro* (267). Le FT clé est BCL6 (268). Les LT TFH résident à proximité de la zone des LB dans les ganglions et jouent un rôle clé dans l'activation, la prolifération et l'amélioration de la survie des LB en leur fournissant le 2ème signal (269,270). Ils remplissent leur rôle par la production du ligand de CD40 et de l'IL-21 activant la voie non canonique de NF- κ B et STAT3. Dans un premier temps ils interagissent avec les LB à l'intersection entre la zone T et la zone B puis dans le centre germinatif qu'ils participent à former. Ils permettent la génération d'Ig de haute affinité par hypermutation et commutations de classes via leur production d'IL-6, de TGF- β , d'IFN- γ et d'IL-4 (271). Ils participent également à guider la différenciation des LB en plasmoblastes, plasmocytes sécréteurs d'Ac et LB mémoires (271). C'est l'expression de CXCR5, récepteur de la chimiokine CXCL13 produite par les cellules stromales des follicules à cellules B, qui permet la migration des LT TFH vers les follicules de LB. Ils se caractérisent également par l'expression d'ICOS et PD-1 (272). Comme vu précédemment les LB de leur côté soutiennent la différenciation en TFH par la stimulation d'ICOS via leur expression de son ligand (272). Ces différentes caractéristiques sont cruciales pour comprendre la complexité de l'AITL, dans lequel les cellules tumorales adoptent systématiquement un profil TFH – voire dérivent d'un TFH (34).

C'est cette coopération entre LB et LT TFH qui leur confère une valeur pronostique dans le cancer (273–277). En effet en situation chronique tel que le cancer, ils interagissent ensemble afin de former des structures ressemblant au centre germinatif, les TLS, dans le TME. Or une forte densité en TLS confère un bien meilleur pronostic dans différentes tumeurs solides et une meilleure réponse aux immunothérapies (273–277). De même une signature TFH dans la tumeur est de bon pronostic (278,279).

(6) T cytotoxiques

La sous population des LT CD4⁺ cytotoxiques est un peu particulière. Pouvant ressembler aux Th1 par la production de leurs cytokines : IFN γ , TNF α , IL-2, ces cellules sont caractérisées par leur expression du Granzyme B, de Perforine et de Granulolysine (280). Chez la souris, elles expriment le récepteur de surface CRTAM (281). Ces cellules peuvent avoir une action cytotoxique directe contre les pathogènes et les cellules endommagées (infectées, tumorales...), ainsi leur fonction se rapproche des LT CD8⁺ cytotoxiques. Elles sont donc capables d'exercer un rôle direct sur les cellules tumorales,

notamment démontré dans le mélanome (282). Leur présence et leur fonction chez l'homme est en cours d'investigation.

c) Lymphocytes T régulateurs

(1) Généralités

Les LT régulateurs représentent entre 5 et 10% des LT CD4⁺ circulant (283). Leurs fonctions principales sont de maintenir la tolérance du soi, de prévenir les maladies inflammatoires et auto-immunes en limitant notamment les réponses immunitaires par leurs capacités immunosuppressives (283). Les différentes voies de signalisation et facteurs de transcription régulant l'activité des Treg sont détaillées dans la revue écrite au cours de ce projet de thèse présenté en annexe 1 (283). Brièvement le FT clé, Forkhead Box Protein 3 (FOXP3), va conférer aux Treg leurs fonctions immunosuppressives (284). Ainsi une délétion germinale de *Foxp3* chez la souris conduit à l'absence de Treg et à un syndrome auto-immun léthal (285) et une mutation du gène de *FOXP3* chez l'homme dans le syndrome IPEX (dérégulation immunitaire, polyendocrinopathie, enteropathie, liées à l'X) est responsable d'un syndrome auto-immun agressif (286,287).

Ils peuvent provenir, comme les LT effecteurs ci-dessus, de la différenciation d'un LT naïf à la périphérie, ils sont dit induits (iTreg), mais également de la différenciation de thymocytes immatures dans le thymus, ils sont dit Treg naturel (nTreg) (288). Les nTreg semblent provenir de thymocytes hautement réactifs au complexe peptide du soi : CMH du soi par sélection positive agoniste. La polarisation de iTreg est induite par le TGFβ et l'IL-2 (289,290).

Ils remplissent leurs fonctions immunosuppressives par de nombreuses méthodes (291). Ils peuvent notamment entrer en compétition avec les autres LT pour la consommation de l'IL-2, grâce à l'expression constitutive à leur membrane de son récepteur de haute affinité, le CD25 (291). Ensuite via l'expression membranaire de protéines inhibitrices (Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) ; PD-1 ; Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)), dont CTLA-4 en densité élevée, qui permet la liaison compétitrice aux molécules B7 sur les CPA et altère leur maturation (291). Enfin via la sécrétion de cytokines inhibant les réactions immunitaires et inflammatoires (TGFβ, IL-10 et IL-35) et la dégradation de l'adénosine triphosphate (ATP), ils inhibent ainsi la prolifération des LT, l'expression par les CPA du CMH, des molécules costimulatrices et des cytokines pro-inflammatoires (291). Enfin, ils peuvent exercer une activité cytotoxique directe, en particulier contre les cellules dendritiques ou les LT effecteurs infiltrant les tumeurs via le GZMB (291).

L'équipe de Sakaguchi propose une séparation en Treg au repos ou naïf et Treg activés en fonction de l'expression de FOXP3 et de CD45RA (292). Ainsi les Treg FOXP3⁺ CD45RA⁻ sont dits activés et présentent des capacités immunosuppressives plus fortes que les Treg naïfs FOXP3⁺ CD45RA⁺.

(2) Impact dans le cancer

L'infiltration du TME par les Treg est décrit dans les tumeurs murines et humaines (293). Par leur fonction immunosuppressive, les Treg maintiennent l'homéostasie des cellules immunitaires et peuvent également supprimer les réponses immunitaires antitumorales. Elles peuvent être exploitées par les cellules tumorales pour l'évasion immunitaire (294). In vivo, dans des modèles murins de cancer l'utilisation d'AcM anti-CD25 ou de splénocytes délétés en cellules CD25⁺ entraîne un rejet ou une diminution de la croissance tumorale, démontrant ainsi l'action pro tumorale des Treg (295,296). De ce fait, il est admis que dans de divers cancers l'infiltration par les Treg confère un mauvais pronostic, et ce d'autant plus lorsqu'il s'agit de Treg activés (293,297).

Devant ces constatations l'une des stratégies à l'étude en immunothérapie du cancer, est la déplétion des LT Treg. En vu de cette objectif différents AcM ont été développés ciblant les marqueurs spécifiques des Treg. Ainsi le ciblage de CD25 a été testé mais avec des résultats discordant et une déplétion possible des LT effecteurs en plus des Treg (298). Concernant le ciblage de CTLA-4, comme nous en discuterons ultérieurement, la déplétion chez la souris des Treg est admise ; en revanche chez l'homme la déplétion par les AcM actuellement utilisés est débattue (299–302). D'autres checkpoints dont nous discuterons sont également exprimés par les Treg et sont à l'étude en immunothérapie (303).

Une autre seconde stratégie consiste à agir sur les signaux de chimiotaxies, afin, comme pour les macrophages immunosuppresseurs, de réduire le recrutement des Treg. Cibler CCR10, CCR4, ou CCR8, chimiokines en lien avec les Treg infiltrant les tumeurs, sont des stratégies attrayantes dans les cancers (304–306).

Enfin une troisième stratégie vise à moduler les effets inhibiteurs des Treg, par exemple en ciblant l'IL-10, le TGFβ, ou encore en visant les ectoenzymes « inhibitrices » CD39 et CD73 fortement exprimées par les Treg chez la souris, dont nous reparlerons largement ultérieurement (307).

d) Lymphocytes T CD8⁺

Les LT CD8⁺ sont considérés comme les effecteurs majeurs de la lutte antitumorale, comme les antigènes infectieux ils peuvent reconnaître les antigènes tumoraux présentés via le CMH-I (308).

L'évolution et la différenciation des LT CD8⁺ en cas de résolution ou d'agression chronique sont représenté à la figure 3 (228,309).

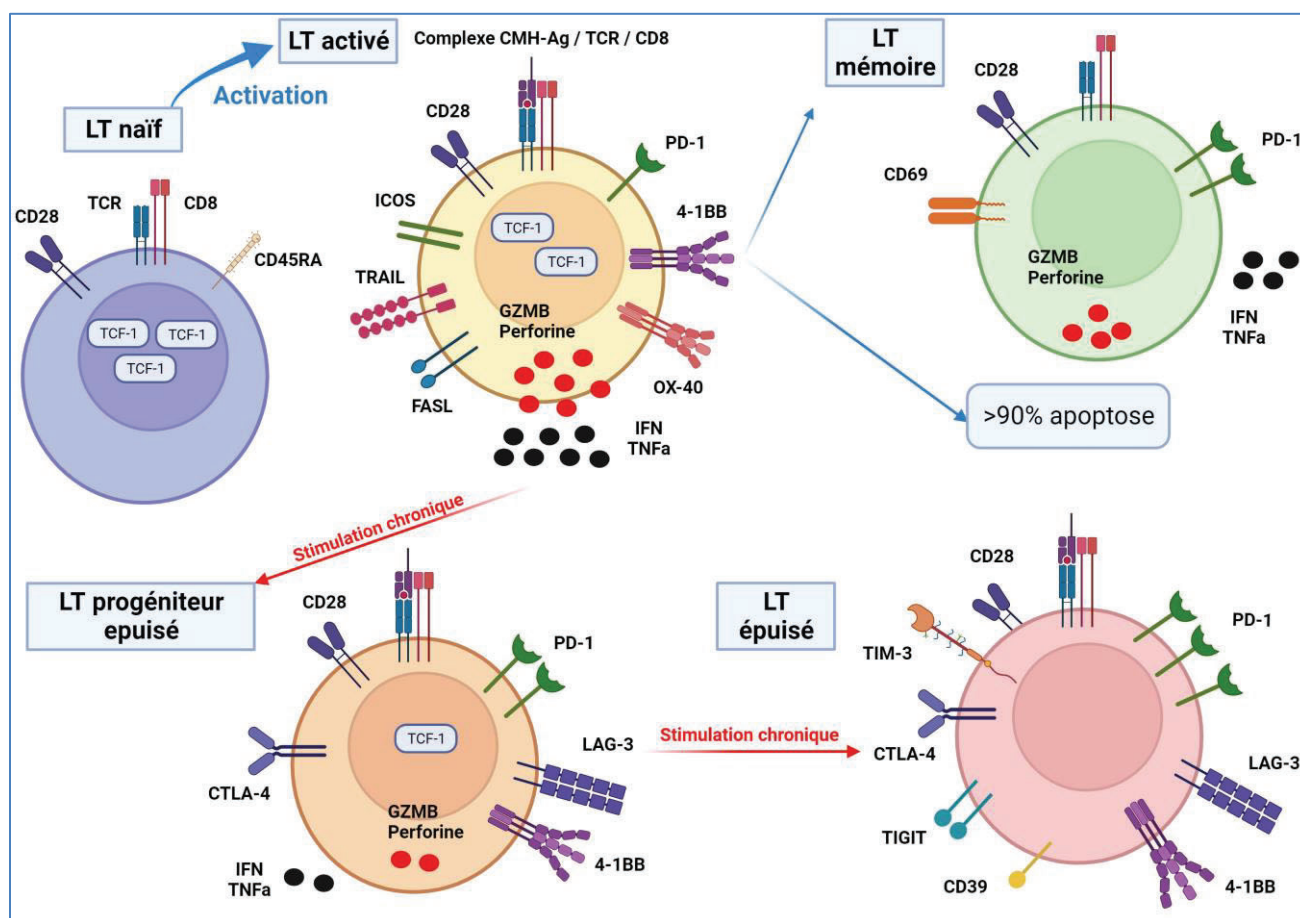


Figure 3. Différenciation physiologique et pathologique des LT CD8⁺. (D'après Philip M, Schietinger A., Nat Rev Immunol. 2022 (228)). Figure réalisée avec BioRender.com. Abréviations : LT, Lymphocyte T ; CD, cluster de différenciation ; TCR, récepteur cellules T ; Ag, Antigène ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; PD-1, Programmed cell death protein 1 ; CTLA-4, Cytotoxique-T-Lymphocyte-Antigen 4 protein ; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3 ; LAG-3, Lymphocyte-activation gene 3 ; TIGIT, T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains ; ICOS, Inducible T-cell COSTimulator ; GZMB, granzyme B ; IFN, Interféron ; TNF, tumor necrosis factor ; FASL, Fas ligand ; TRAIL, tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand.

(1) LT CD8⁺ Cytotoxiques

La caractéristique majeure des LT CD8⁺ est leur rôle cytotoxique direct contre les cellules endommagées en induisant leur apoptose par la voie intrinsèque ou extrinsèque (225,228). La voie intrinsèque est possible par la formation d'une synapse immunologique entre le LT CD8⁺ et sa cellule cible qui permet une liaison ferme et un relargage focalisé et dirigé des granules cytotoxiques limité à cette cellule cible (225,228). Ces granules contiennent les molécules effectrices cytotoxiques préformées : perforine ; granzymes ; granulysine. La perforine forme des pores ou perfore la membrane plasmatique permettant l'entrée du granzyme et de la granulysine. Le granzyme déclenche l'apoptose par activation des caspases directement ou par dégradation des mitochondries qui entraine la libération

du cytochrome C et la formation de l'apoptosome activant la pro-caspase 9. Les LT CD8⁺ peuvent remplir d'autres fonctions, par notamment la production d'autres cytokines telles que l'IFN γ , le LT α et le TNF α qui participent notamment au recrutement et à l'activation d'autres cellules immunitaires telles que les macrophages (225,228).

(2) LT CD8⁺ Mémoires

Alors que plus de 90% des LT CD8⁺ effecteurs meurent par apoptose après une agression, un petit sous-ensemble, dépendant de l'IL-15 et l'IL-7, survit et devient des LT CD8⁺ mémoires (310). Les cellules T mémoires se divisent en 3 grandes groupes dépendant de leurs fonctions effectrices et de leur potentiel prolifératif : les effecteurs mémoires (TEM), les centrales mémoires (TCM) et les résidents mémoires (TRM) (311–313). Ainsi les TCM, en opposition au TEM sont retenues dans les organes lymphoïdes secondaires par l'expression de CCR7 et CD62L et ont une capacité de prolifération et de production d'IL-2 accrue, alors que les TEM se retrouvent dans le sang et les tissus non lymphoïdes et sont reconnus pour leur capacité de production de molécules effectrices immédiates. Les TRM comme leur nom l'indique résident de manière permanente dans les tissus après résolution d'une agression et sont capables de produire des molécules effectrices de manière soutenue (314).

(3) LT CD8⁺ « épuisés »

Alors que l'infiltration tumorale par les LT CD8⁺ est un marqueur pronostique favorable dans de nombreuses tumeurs solides (293), ces cellules ne parviennent pas toujours à éliminer efficacement les cancers (315). L'une des raisons est un défaut dans les fonctions effectrices de ces LT CD8⁺. En effet, dans le cadre d'infection chronique et de cancer, un nouvel état d'activation des LT CD8⁺ a été identifié : l'épuisement (exhaustion) (228,309).

Initialement, cet état a été décrit chez la souris dans le cadre d'une infection au virus de la chorioméningite lymphoïde (LCMV). Ainsi une infection aiguë par la souche LCMV Armstrong entraîne une réponse infectieuse efficace et la résolution de l'infection en 8 à 10 jours avec production de LT CD8⁺ effecteurs et mémoires fonctionnels (316). A l'inverse, une infection chronique consécutive à l'injection du clone 13 de LCMV, est associée à la persistance de LT spécifiques du virus capables de proliférer et d'exprimer des marqueurs d'activation, mais présentant un défaut dans leur fonction effectrice (incapacité à tuer les cellules infectées et à sécréter de l'IFN γ) (317). L'épuisement fonctionnel des LT CD8⁺ a ensuite été identifié dans de nombreuses infections chroniques chez l'homme tels que le VIH, le virus de l'hépatite B et de l'hépatite C (318–321). Les travaux de l'équipe de John Wherry suggèrent que les pertes de fonctions sont progressives et hiérarchisées au cours du temps lors d'infection chronique à LCMV avec la notion de passage par un

état d'épuisement partiel dit « T_{pex} » de progéniteurs épuisés, puis de « T_{ex} » épuisés (322). De façon importante, et à l'inverse des LT CD8⁺ effecteurs « normaux », les T_{pex} et T_{ex} expriment de forts niveaux du récepteur PD-1 (323), faisant de PD-1 une protéine de la signature des LT « épuisés ». D'ailleurs, dans cette même étude le traitement par anticorps bloquant anti-PD-1 permet de réduire la charge virale de LCMV clone 13, via une amélioration du nombre et de la fonction des LT CD8⁺ spécifiques. Ces données ont ensuite été confirmées *in vitro* chez des patients atteints de VIH et autres infections chroniques (324–327). Depuis, des analyses par cytométrie et transcriptomique ont permis de largement raffiner le phénotype des T_{ex} (228,309). Ceux-ci expriment en fait de nombreux récepteurs inhibiteurs tels que T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3 (TIM-3), LAG-3 ou CTLA-4. Il a d'ailleurs été proposé que la co-expression de PD-1 et TIM-3 permettait une identification très spécifique des T_{ex} (328), et nous avons utilisé cette stratégie dans mes projets.

Au niveau mécanistique, il semble qu'une série de facteurs de transcription, notamment NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) et TOX (Thymocyte selection-associated high mobility group box protein), soutiennent la différenciation en T_{ex} (228,309).

Au-delà du contexte des infections chroniques, un état d'épuisement est également retrouvé très fréquemment dans le micro-environnement tumoral chez l'homme et la souris (329). De ce fait, ces cellules font l'objet d'un intérêt majeur en immunothérapie.

C. Ciblage thérapeutique des récepteurs (checkpoints) activateurs et inhibiteurs sur les LT

Les premières immunothérapies approuvées dans les cancers furent les cytokines après avoir démontré leur soutien à la réponse immunitaire antitumorale innée et adaptative pour (INF α ; IL-2 ; GM-CSF) mais leur succès est resté limité et sont actuellement en étude en association avec d'autres immunothérapies (330,331).

En tant qu'élément majeur de la lutte antitumorale, c'est la compréhension toujours plus grande du phénotype, des mécanismes d'activations et d'épuisements des LT qui a conduit à la révolution dans l'immunothérapie et la prise en charge des cancers. Le développement des immunothérapies a suivi la découverte et la compréhension des différents points d'activations et d'inhibition. Ce point étant un élément crucial de mes travaux de thèse, je vais maintenant détailler certaines de ces molécules, répertoriées sur la figure 4.

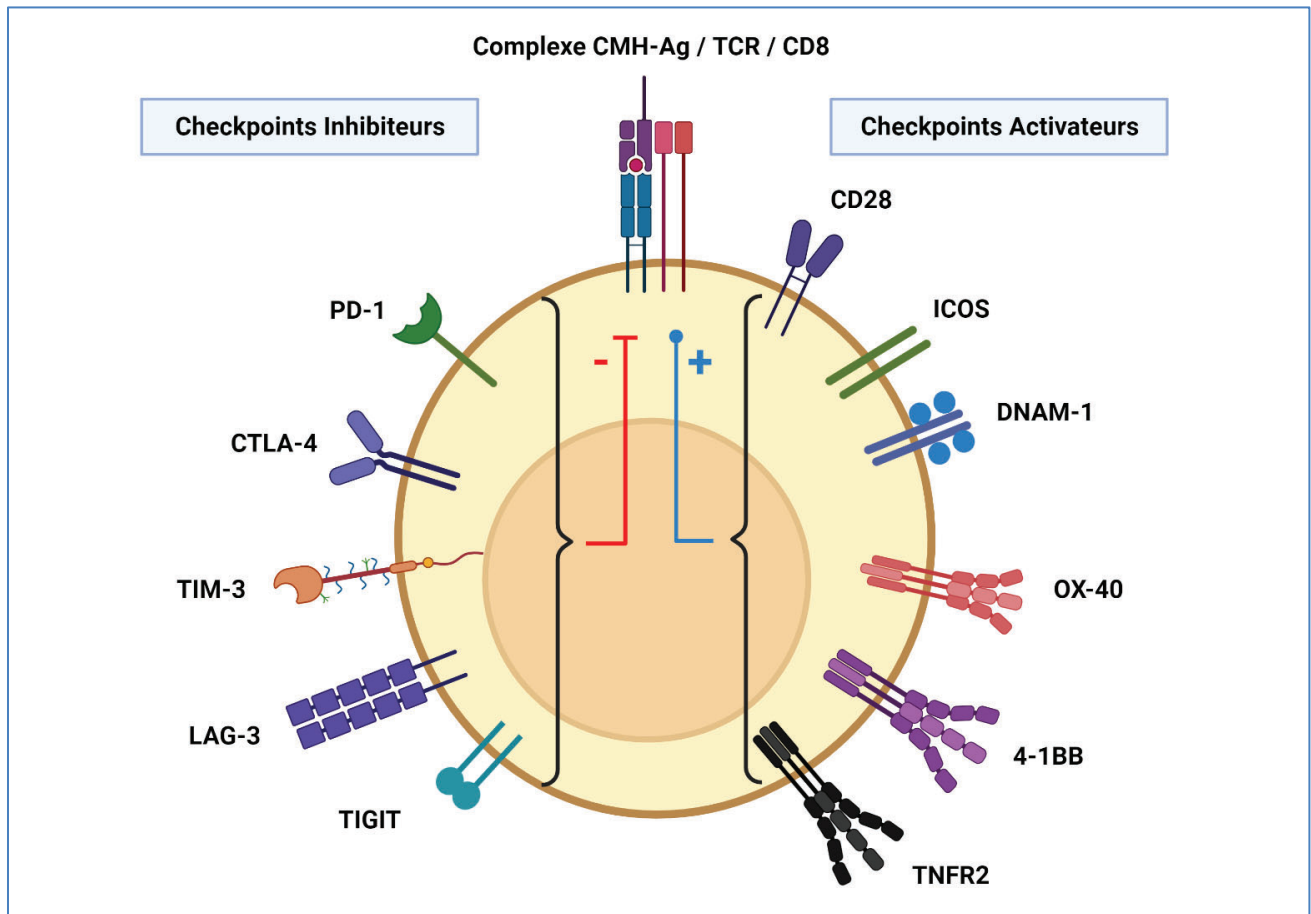


Figure 4. Quelques checkpoints activateurs et inhibiteurs des LT étudiés au cours de mon projet de thèse. Figure réalisée avec BioRender.com. Abréviations : CD, cluster de différenciation ; TCR, récepteur cellules T ; Ag, Antigène ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; PD-1, Programmed cell death protein 1 ; CTLA-4, Cytotoxique-T-Lymphocyte-Antigen 4 protein ; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3 ; LAG-3, Lymphocyte-activation gene 3 ; TIGIT, T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains ; ICOS, Inducible T-cell COStimulator ; DNAM-1, DNAX accessory molecule-1.

1. CTLA-4

La protéine à domaine immunoglobuline CTLA-4, appartenant à la famille CD28, a été décrite pour la première fois dans les années 80 par l'équipe de Pierre Goldstein, révélant une expression préférentielle dans les lymphocytes activés (332). Le gène codant pour l'homologue humain de CTLA-4 a ensuite été cartographié dans la même région chromosomique que CD28 (333,334). Le domaine extracellulaire de CTLA-4 se lie aux molécules CD80/CD86 (B7) avec une avidité plus forte que CD28, interférant ainsi avec l'activation des LT et soutenant sa possible utilisation dans l'auto-immunité et la tolérance de greffe d'organe (335). D'autre part le domaine cytoplasmique de CTLA-4 permet le recrutement des phosphatases SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) et de la protéine phosphatase 2 (PP2A), inhibant ainsi le signal TCR/CD28 (336).

La première observation de l'activité inhibitrice de CTLA-4 sur les LT a été faite par l'équipe de Jeffrey Bluestone (337), et il est désormais établi que CTLA-4 a un rôle majeur dans la tolérance immunitaire. En effet les souris déficientes en CTLA-4 meurent en 3 à 4 semaines d'une auto-immunité systémique et d'une lymphoprolifération mortelle (338,339). De même chez l'homme les polymorphismes de CTLA-4 sont liés à plusieurs maladies auto-immunes (340). Au-delà de son rôle d'inhibition intrinsèque des LT effecteurs, CTLA-4 est exprimé très fortement par les Treg (341). D'ailleurs l'ablation spécifique de *Ctla4* dans les Treg phénotypie les souris *Ctla4^{KO}*, montrant le rôle essentiel de cette protéine dans l'activité des Treg (342). Il semble que CTLA-4 se lie à B7 et induit sa trogocytose par les Treg, diminuant ainsi la capacité des CPA à activer les LT effecteurs (343).

L'ensemble de ces observations a conduit au développement des immunothérapies ciblant CTLA-4 dans le but de lever l'inhibition et de restaurer l'activité cytotoxique antitumorale des LT.

Chez la souris, l'administration d'anticorps anti-CTLA4 permet de diminuer la pousse des tumeurs transplantées, seul ou en combinaison (344,345). D'autres études précliniques soutiennent l'effet du blocage de CTLA-4 sur l'activité antitumorale en association à des vaccins antitumoraux (346), mais également en association à d'autres traitements tels que la radiothérapie et la chimiothérapie (346–348).

L'Ipilimumab, premier anticorps monoclonale humain anti-CTLA-4, a alors été testé avec succès dans des essais cliniques de phase I et II incluant des patients présentant un cancer disséminé de type mélanome, carcinome ovarien ou prostatique (348–350). Ils ont permis de valider son innocuité, sa tolérance et une première activité antitumorale. Les essais probants de phase III ont ensuite conduit à sa première approbation par la Food and Drug Administration (FDA) dans le mélanome.

Concernant son utilisation dans les hémopathies, plusieurs études de phase précoce ont été réalisées. Ainsi dans un essai de phase I, 18 patients présentant un lymphome B en R/R ont été traités par Ipilimumab (351). Le traitement était bien toléré, aucun patient n'ayant présenté d'EI de grade 4/5. 2 patients, le premier présentait un lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) et le second un lymphome folliculaire, ont présenté une réponse clinique. Dans les 2 cas cette réponse était prolongée, respectivement > 31 mois et de 19 mois (351). Un essai récent semble indiquer des résultats prometteurs dans les hémopathies malignes en rechute post allogreffe (352) (LAM, LH, Myélome multiple).

D'autres anticorps anti-CTLA-4 ont également suivi ce processus et de nombreux essais cliniques ciblant ce checkpoint sont en cours dans différents cancers et les autorisations et indications se multiplient.

Il est important de noter que le mécanisme d'action des anticorps anti-CTLA-4 chez l'homme n'est pas totalement compris (300–302). Il pourrait en effet s'agir d'une déplétion des Treg, comme montrée chez la souris, et/ou d'une revigoration des LT effecteurs CTLA-4⁺ (299).

2. PD-1

En 1992 l'équipe de Tasuku Honjo publie ses travaux sur les gènes induisant la mort cellulaire programmée (353). Leur analyse, par hybridation soustractive, de cellules mourantes de 2 lignées cellulaires a permis d'isoler l'ADNc programmed cell death 1 (*Pdcd1*) et d'en déduire une protéine de la superfamille des Ig : PD-1 (353). Leurs analyses ultérieures ont montré chez la souris une faible expression de PD-1 dans les tissus lymphoïdes à l'état basal mais une forte expression par les LT et LB après stimulation in vitro (354). PD-1 est une protéine monomère transmembranaire, membre de la famille CD28 dont une partie de leur séquence est identique (355). Son domaine cytoplasmique est constitué de 2 résidus de tyrosine : Tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) et Tyrosine-based switch motif (ITSM) (355). L'engagement du récepteur, comme avec les autres récepteurs possédant un motif ITIM, entraîne la phosphorylation du résidu tyrosine recrutant la phosphatase SHP-2 qui déphosphoryle plusieurs événements proximaux du TCR et de CD28, dont les molécules effectrices en aval, telles que Syk, PI3K, ZAP70 et CD3 ϵ , induisant l'inhibition de l'activation des LT (355).

La recherche des ligands de PD-1 a permis d'identifier 2 molécules initialement décrites comme homologues de B7 mais ne liant ni CD28 ni CTLA-4 : PD-L1 et PD-L2 (356,357). L'expression de PD-L1 a été notée dans de nombreux tissus lymphoïdes et non lymphoïdes à l'état basal tandis que PD-L2 est peu exprimé dans les cellules au repos. La stimulation des différentes cellules présentatrices d'antigène augmente l'expression de ces molécules (358). De façon importante, PD-L1 et/ou PD-L2 sont souvent retrouvés sur les cellules tumorales.

Les modèles murins ont permis une première compréhension de l'action de PD-1 au niveau basal. Les souris déficientes en PD-1, les souris *Pdcd1*^{-/-} présentent une splénomégalie, reflet d'une augmentation des cellules lymphoïdes et myéloïdes, mais sans auto-immunité systémique comme les souris déficientes pour CTLA-4 (359). La prolifération de leur LB et LT, lors d'une stimulation respectivement par anti-IgM ou par Ac anti-T indépendant d'Ag, était plus importante que celle des cellules de souris sauvages orientant vers une action négative sur l'activité des lymphocytes (359).

D'autres modèles de souris ont montré qu'un déficit de *Pdcd1* entraîne ou accélère des maladies auto-immunes, soutenant la participation de PD-1 à la tolérance du soi (360).

L'effet inhibiteur de l'engagement de PD-1 est un mécanisme critique de l'échappement des tumeurs à la réponse T. Il a tout d'abord été montré que la surexpression transgénique de PD-L1 dans une lignée cellulaire de mastocytome (P815), augmente l'agressivité des tumeurs et diminue la production de granzyme et d'IFN γ par les LT CD8⁺ (361,362). Ce processus étant abrogé dans les souris PD-1-KO. Les cellules P815 surexprimant PD-L1 résistent également mieux à la lyse par les cellules cytotoxiques in vitro et in vivo (362). L'utilisation d'anticorps anti-PD-L1 réduit d'ailleurs la croissance de lignée tumorale de myélome exprimant naturellement PD-L1 chez la souris, démontrant pour la première fois le potentiel thérapeutique du blocage de la voie PD-1/PD-L1 (361). Les anticorps bloquant anti-PD-1 ont ensuite confirmé ce potentiel anti-tumoral dans le mélanome (B16) et le cancer du colon (CT26), parmi bien d'autres types tumoraux (363).

Chez l'homme l'expression des ligands de PD-1 est retrouvée sur diverses cellules tumorales et sur certaines cellules immunitaires, notamment les macrophages, et est corrélée à un mauvais pronostic dans différents cancers (364–368). Comme décrit plus haut, PD-1 est largement exprimé par les LT infiltrant les tumeurs solides, notamment les LT CD8⁺ épuisés (369).

L'ensemble de ces données précliniques a permis de débiter des essais cliniques bloquant l'axe PD-1/PD-L1/L2 chez l'homme dans divers cancers. Les essais de phase I/II ont validé l'innocuité et l'activité de différents anticorps dans divers cancers avancés : ciblant PD-L1 (370) ; PD-1 (371–373).

Le 04 septembre 2014, la première thérapie par anticorps bloquant PD-1, le Pembrolizumab, est autorisée par la FDA dans le traitement des mélanomes non résecables ou métastatiques sur les bases des résultats des essais de phase précoce et sous couvert de leur confirmation dans les essais de phase III.

Depuis de nombreux essais cliniques ont étudié le blocage de la voie PD-1/PD-L1/L2 et d'autres sont en cours, élargissant toujours les indications de ces traitements. Des résultats impressionnants ont par exemple été décrits après administration à des phases précoces (stades II/III) en situation néo-adjuvante, atteignant 100% de réponse clinique complète chez des patients souffrant d'adénocarcinome du rectum localement avancé « mismatch repair-déficient » (374).

Concernant les hémopathies malignes, les conclusions sont plus nuancées. Chez les patients présentant un lymphome/leucémie à cellule T de l'adulte, l'expression de PD-1 par les LT CD8⁺ est

significativement augmentée par rapport aux témoins présentant une infection par HTLV1 sans ATLL et au donneur sain (375). Concernant les LNH, de par leur cellule d'origine, il n'est pas étonnant que les AITL expriment PD-1 et que leurs DC associés à la tumeur expriment PD-L1 (27,376). Dans les LNH B l'expression de PD-1 par les cellules tumorales est surtout associée à la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et au lymphome lymphocytaire (376,377). Concernant le lymphome de Hodgkin, les résultats de l'expression de PD-1 sont contradictoires. En effet dans certaines analyses son expression est faible ou absente du microenvironnement dans la majorité des cas, mais dans d'autres elle est augmentée sur les LT infiltrant le LH (378,379). En revanche l'expression de PD-L1 était constamment élevée à la fois sur les cellules de Hodgkin Reed-Sternberg et du microenvironnement (378,379). Le blocage de PD-1 ou PD-L1 dans les LH donne des résultats spectaculaires, avec plus de 80% de taux de réponse chez les patients en rechute ou réfractaires aux traitements conventionnels (380) ; des résultats intéressants sont également décrits dans le myélome multiple ou le lymphome folliculaire (381). Les résultats sont beaucoup plus contrastés dans les PTCL, comme nous en discuterons ultérieurement.

3. *TIM-3*

TIM-3 a été identifiée pour la première fois par l'équipe de Monney et al. qui cherchait les molécules de surfaces distinguant les LT Th1 des Th2 (382). Initialement TIM-3 a donc été décrite comme une protéine transmembranaire exprimée à la surface des LT Th1, et transduisant un signal inhibiteur (382). TIM-3 peut être exprimée par de nombreuses cellules dont les LT activés de type CD4⁺ Th1, LT CD8⁺ cytotoxiques, les Treg ; les LT mémoires ; Le LB ; les NK ; Les monocytes ; les macrophages ; les DC ; et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (383). Plusieurs ligands de TIM-3, notamment la galectine-9, ont été identifiés et peuvent être exprimés par différents types cellulaires dont les CPA, les cellules en apoptose ou encore les cellules tumorales (383). Leur liaison à leur récepteur induit l'inhibition de l'activité du LT exprimant TIM-3. Sa partie extracellulaire contient un domaine d'immunoglobuline et un domaine mucine avec des site de glycolisation (383). Son signal intracellulaire est transduit par les résidus tyrosines de son domaine intracellulaire, qui lors de leur phosphorylation libèrent la molécule répresseur de TIM-3 : BAT3 (384).

Il est intéressant de noter que la majorité des LT CD8⁺ du microenvironnement tumoral qui expriment TIM-3 co-expriment également PD-1, alors que l'inverse n'est pas vrai (385). Les analyses des lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) de mélanome ont retrouvé que les LT spécifiques de la tumeur sont enrichis en LT exprimant les récepteurs inhibiteurs dont PD-1, LAG-3 et TIM-3 (386). In vitro ces LT CD8⁺TIM-3⁺PD-1⁺ étaient moins fonctionnels que ceux exprimant essentiellement PD-1

ou n'exprimant aucun des 2 récepteurs et qu'ils produisaient moins de cytokines de type IFN γ , TNF et IL-2 (328). Un pourcentage élevé de LT CD8⁺ coexprimant PD-1 et TIM-3, ainsi que LAG-3, confère un mauvais pronostic dans le carcinome rénal ou hépatocellulaire (387). TIM-3 semble donc dénoter un état de dysfonction profond. Le blocage de TIM-3 par anticorps antagonistes, améliore la fonction T et NK tout en diminuant la fonction des Treg, fournissant un fort rationnel à son ciblage thérapeutique (388,389). Par exemple, le blocage conjoint de PD-1 et TIM-3 dans un modèle de cancer du colon CT-26, permet une forte diminution du volume tumoral et une régression complète chez 50% des souris (390).

Des essais cliniques de phases précoces étudiant les traitements bloquant la voie TIM-3 seule ou en association sont actuellement en cours. Néanmoins, dans les hémopathies malignes et notamment les LAM et ATLL, TIM-3 est exprimée par les cellules tumorales elles-mêmes et sa forte expression confère un mauvais pronostic, mettant un frein à son développement thérapeutique à l'heure actuelle (391,392).

4. *LAG-3*

LAG-3 a été identifié en 1990 comme un homologue de CD4, exprimé par de multiples cellules différentes telles que les LT activés CD4⁺ et CD8⁺, les Treg, les NK et les pDC (393). Il s'agit d'une molécule de surface qui se lie aux molécules de CMH-II avec une affinité plus forte que CD4 (393). D'autres ligands que les molécules du CMH-II sont supposés mais encore très controversés, et LAG-3 peut également interagir avec le complexe TCR-CD3 en l'absence de CMH-II supposant que ce complexe puisse également agir comme ligand (394).

LAG-3 est un récepteur inhibiteur, il régule négativement l'expansion et l'homéostasie des LT entraînant une baisse de leur activation (393). Dans un modèle de souris NOD, connues pour développer des diabètes, le déficit en LAG3, par blocage ou délétion, a induit dans 100% des cas un diabète considérablement accéléré et une augmentation de l'infiltration par les LT CD8⁺ et CD4⁺ des îlots, suggérant un rôle immunosuppresseur de LAG-3 (395). De plus les Treg LAG-3⁺ présentent chez la souris et chez l'homme une activité régulatrice plus importante (396,397).

Dans 2 modèles de cancers murins (fibrosarcome Sa1N et cancer colorectal MC38), l'utilisation d'un traitement combinatoire bloquant la voie PD-1 et LAG-3 était plus efficace que l'utilisation de ces traitements en monothérapie (398). Un modèle murin de cancer de l'ovaire a confirmé l'intérêt de ce double blocage sur les fonctions effectrices des LT et la croissance tumorale

(399). D'autres modèles murins ont confirmé le bénéfice de son association au bloqueur de PD-1 mais également de CTLA-4 dans la croissance tumorale (400).

Un essai clinique de phase II/III randomisé a évalué dans le mélanome disséminé, l'association du relatlimab (anti-LAG-3) et du nivolumab (anti-PD-1) par rapport au nivolumab seul (401). A 12 mois l'association thérapeutique a permis l'obtention d'une SSP supérieure (47.7% vs 36.0%), entraînant l'approbation par la FDA de cette association dans le traitement du mélanome disséminé (401).

5. *TIGIT et DNAM-1*

TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) et DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1) fonctionnent d'une manière similaire au binôme CD28 et CTLA-4. En effet ils se lient tous les 2 aux mêmes ligands (CD155 et CD112) et entraînent chacun des signaux contraires (402,403). Alors que DNAM-1 est un régulateur positif des LT comme CD28, TIGIT est un régulateur négatif comme CTLA-4 (403). L'expression de CD155 et CD112 est retrouvée dans de nombreux sous types cellulaires hématologiques et non hématologiques et est importante dans plusieurs lignées cellulaires de cancers murins et également dans différents cancers humains (404).

TIGIT est exprimé par les Treg, LT mémoires, les LT activés et les NK, en particulier dans le contexte tumoral (405–407). Il s'agit d'une protéine transmembranaire avec un domaine extracellulaire de type Ig (405). Comme pour PD-1, la voie directe de signalisation inhibitrice de TIGIT passe par les 2 motifs ITIM de sa queue cytoplasmique et SHP et en entrant en compétition avec DNAM-1 pour sa liaison à leurs ligands (406,408). Il peut également réguler négativement l'activation des LT en induisant la production d'IL-10 par les DC (405). Dans un modèle murin de sclérose en plaques, la déficience en TIGIT aggrave la maladie et augmente la prolifération et la production de cytokines pro-inflammatoires par les LT (406).

L'expression de TIGIT est enrichie sur les TIL de différents cancers chez l'homme et la souris, et concomitante à d'autres marqueurs inhibiteurs (405–407). Les LT CD8⁺ exprimant TIGIT sont défectueux dans leur production de cytokines pro-inflammatoires (409). Chez la souris le déficit en TIGIT retarde significativement la croissance tumorale et augmente la prolifération et les réponses cytokiniques pro-inflammatoires des LT CD8⁺ spécifiques des tumeurs (409). Ceci est peut-être dû au rôle de TIGIT sur les Treg, qui promeut leur fonction suppressive (409,410).

Dans le cancer du colon et du sein chez la souris, le traitement associant un anti-TIGIT et un anti-PD-L1 a amélioré la fonction effectrice des TIL CD8⁺ et permis de réduire plus efficacement la

charge tumorale que les traitements en monothérapie (411). Des résultats similaires ont été montrés dans le myélome multiple chez la souris, et le blocage de TIGIT restaure la fonction *in vitro* des LT CD8⁺ de patients atteints de cette maladie (412).

A l'heure actuelle plusieurs AcM ciblant TIGIT ont été développés et sont en cours d'étude dans des essais cliniques de phase précoce et de phase III. L'étude de phase II CITYSCAPE incluant 135 patients présentant un cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) disséminé en première ligne PD-L1 positif comparait l'association du Tiragolumab (anti-TIGIT) et l'Atézolizumab (anti-PD-L1) à l'Atézolizumab seul (413). La bithérapie a permis un meilleur taux de réponse objective. D'autres thérapies ciblant TIGIT sont en cours d'évaluation dans le cancer, le plus souvent en association avec des thérapies ciblant la voie PD-1 (414).

6. ICOS

ICOS, autre membre de la famille CD28, a été décrit pour la première fois chez la souris par l'équipe de Yoshinaga et al. qui a également identifié son ligand (B7-h2, ICOS-L) (415) ; et chez l'homme par Hutloff et al. (416).

Chez la souris comme chez l'homme ICOS est retrouvé essentiellement sur les LT activés, d'où son nom « inductible » et également sur les LT mémoires au repos (415,416). Comme nous en avons discuté précédemment, il est constitutivement exprimé par une partie des Treg, notamment dans le microenvironnement tumoral (417) et par les LT de type TFH (269,270). Il est important dans la formation des centres germinatifs et pour la maturation terminale des LB (269,270,418,419). Son ligand est exprimé par de nombreux types cellulaires hématologiques, dont les CPA, et également non hématologiques (420).

Comme pour CD28 l'engagement d'ICOS induit l'activation et la différenciation des LT (416,421). De manière plus spécifique, la signalisation ICOS favorise la différenciation en Th1 et/ou Th2 (416,421). Chez l'homme le déficit d'expression d'ICOS induit un déficit immunitaire commun variable dû à un défaut dans la différenciation tardive des LB, leur commutation de classe et la génération de LB mémoire (418,419). Ces patients présentent une susceptibilité aux infections bactériennes, aux manifestations auto-immunes et aux cancers (419).

De plus ICOS est largement exprimé par différents types de LT dans le microenvironnement tumoral, en faisant une cible de choix (422). Ainsi, des anticorps agonistes d'ICOS ont été développés pour favoriser la réactivation des LT effecteurs en complément d'anticorps anti-CTLA-4 et/ou anti-PD-1, avec une bonne efficacité chez la souris dans des modèles de tumeurs solides (423,424).

Néanmoins, ceci doit être tempéré du fait de l'expression d'ICOS par les Treg qui a conduit à l'inverse au développement d'anticorps antagonistes ou déplétant (425). De plus, dans le cadre du lymphome T ALK⁺, l'expression d'ICOS est fréquente et est induite par la fusion *NPM-ALK* et son engagement augmente la prolifération de ces cellules tumorales (426). A ce jour, à mes yeux, ces études contradictoires ne fournissent pas un rationnel suffisamment fort au ciblage généralisé d'ICOS en immunothérapie des cancers.

7. *TNFRSF*

Outre les récepteurs dont nous avons discutés qui appartiennent pour la plupart à la famille CD28, il existe une autre grande famille de récepteurs costimulateurs des LT : la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFRSF), à laquelle appartiennent notamment OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) et TNFR2, dont j'ai analysé l'expression dans le microenvironnement tumoral au cours de ma thèse (427). Leur ligands (OX40L...) sont membres de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNFSF).

a) OX40 (CD134)

L'expression d'OX40 est fortement régulée par divers signaux dont celui du TCR et de certaines cytokines, notamment l'IL-2 (428). Absent à la surface des LT naïfs, il est exprimé après activation par les LT CD4⁺ et CD8⁺ et les Treg, et également par les neutrophiles et les NK (429). De même son ligand n'est exprimé, qu'après stimulation, par plusieurs types cellulaires dont les CPA professionnels, les NK, les mastocytes et certaines cellules endothéliales.

Dans les LT activés, l'engagement de OX40 induit un signal positif et stimule leur prolifération, leur production de cytokines notamment pro inflammatoires et leurs fonctions cytolytiques effectrices (429). Il participe également à la survie au long court et à l'établissement des clones mémoires de LT. Dans les cellules NK il peut stimuler leur fonction effectrice (430). Dans les Treg, l'impact de l'engagement d'OX40 semble dépendre du moment de maturation, important pour leur développement, leur homéostasie et leur activité suppressive, des données montrent qu'il peut également réduire leur activité immunosuppressive, voire induire leur expression de cytokines inflammatoires (431,432).

Il semblerait que OX40L soit peu présent dans l'environnement tumoral. En revanche OX40 est retrouvé dans les cancers, par exemple dans le lymphome folliculaire sur les Treg FOXP3⁺ (431). Dans des modèles murins immunocompétents de différents cancers, le traitement par agoniste d'OX40 retarde la croissance tumorale et augmente significativement le pourcentage de TIL CD8⁺ et leur

capacité à produire de l'IFN γ (433,434). Les études par transfert adoptif de LT CD8⁺ exprimant ou non OX40 ont montré que son expression était nécessaire pour un effet positif de l'agoniste d'OX40 sur les CD8⁺ (433). L'association d'un agoniste de OX40 potentialise l'effet des anti-CTLA-4 et anti-PD-1 (435,436).

Fort de ces résultats des essais cliniques ont été mis en place chez l'homme. Des études de phase I/II ont analysé l'innocuité et l'efficacité des traitements ciblant OX40 en monothérapie dans plusieurs cancers solides avancés ou métastatiques (437,438). Les traitements étaient bien tolérés mais les réponses tumorales étaient limitées (437,438). Ils ont ensuite été testés en association avec des traitements ciblant la voie PD-1 ou CTLA-4 dans plusieurs cancers avancés, bien que l'innocuité soit bonne, les premiers résultats concernant l'efficacité ne sont pas clairs (439,440). Plusieurs essais de phase précoce analysant l'association avec les inhibiteurs de checkpoint mais également avec les agonistes des TLR, ou d'autres agonistes des LT, la radiothérapie, les cytokines tels que l'IL-2... sont encore en cours.

b) CD137 (4-1BB)

CD137, décrit pour la première en 1989, est induit lors de l'activation des LT, LB et NK (441,442). Son engagement après liaison à son ligand (CD137L) recrute TRAF1 et TRAF2 et induit la signalisation intracytoplasmique via les FT NF-kB et MAPKs coactivant les LT et les NK (443). Il entraîne ainsi leur prolifération, leur survie, leur production de cytokines pro inflammatoires, leur fonction cytolytique et leur différenciation en LT mémoire (427). Cette capacité stimulatrice est d'ailleurs utilisée au profit des CAR-T cells, qui comprennent pour certains un domaine intracytoplasmique CD137 (444,445). L'expression de CD137 a été décrite sur d'autres cellules immunitaires, notamment les Treg, mais son rôle reste encore peu compris avec des rapports contradictoires (446).

De façon intéressante, il a été proposé que l'expression de CD137 semble spécifique des TIL réactifs à la tumeur (447). De façon générale, son expression est retrouvée sur des cellules ayant un profil activé voire épuisé (447). Chez l'homme les études de données d'expression génique de microarray de différents cancers ont montré une régulation de CD137 dans les lymphomes folliculaires et les DLBCL et confirmée sur biopsie (448).

Melero et al. ont montré que l'administration d'anticorps agonistes anti-CD137 peut éradiquer différents types de tumeurs immunogènes et peu immunogènes, établis chez la souris et que cette efficacité nécessite les LT CD8⁺ et CD4⁺ et qu'elle s'accompagne d'une augmentation de leur activité

cytolytique (449). Cette efficacité a été confirmée dans d'autres modèles murins de cancer dont des modèles de lymphome B (A20 ou Eu-myc) (448,450). Néanmoins, il semble que l'engagement de CD137 puisse aussi induire l'épuisement des CD8⁺, suggérant un rôle duel de ce signal dans les réponses anti-tumorales (451).

Chez l'homme, les résultats des essais précoces ont été décevants, montrant soit un manque d'efficacité, soit une absence d'effet bénéfique (452,453). Ces résultats décevants poussent à envisager d'autres stratégies, comme l'utilisation d'un nouvel épitope cible ou encore la combinaison en anticorps bi-spécifiques CD137/PD-1. Les résultats préliminaires des essais cliniques précoces retrouvent des profils d'innocuité et de tolérabilité acceptables avec des premiers arguments d'efficacité, mais la majeure partie des résultats est en attente (454). L'anticorps bispécifique visant CD137 et HER2 a montré une bonne tolérance, sans TLD, et un TRG de 40% chez 70 patients présentant un cancer HER2⁺ avancés (455).

c) TNFR2

TNFR2 est exprimé constitutivement par les macrophages et les Treg, et par certains LT effecteurs activés et également par certaines cellules non immunologiques, dont les cellules endothéliales (456). Ses ligands naturels sont le TNF, membranaire et soluble, et la lymphotoxine α . Le TNF est principalement produit par les cellules immunitaires, notamment les LT activés et les macrophages. L'engagement de TNFR2 sur les LT CD8⁺ entraîne leur survie, leur différenciation et leur prolifération (457). Mais son action peut également être négative, en effet les LT CD8⁺ déficients en TNFR2 sont plus résistants à la mort cellulaire induite par l'activation et Fas/FasL et expriment de haut niveau de molécule pro-survie telles que BCL-2, la survivine et CD137 (458). D'autres études soutiennent que l'engagement de TNFR2 entraîne l'augmentation de ROS induisant la mort cellulaire par activation (459). Dans un modèle de souris *Tnfr2*^{-/-}, il est intéressant de noter que la croissance tumorale était plus rapide dans les premiers jours mais finalement plus lente dans la durée que chez les souris WT (458). D'autre part, TNFR2 participe au développement et à la survie des Treg et les Treg TNFR2⁺, retrouvés en grand nombre dans le microenvironnement tumoral, sont très suppresseurs (460).

Enfin, TNFR2 peut avoir une activité oncogène directe sur les cellules tumorales. Il est par exemple retrouvé des mutations récurrentes et des gains génomiques du gène de TNFR2 augmentant la signalisation NF- κ B dans le lymphome T cutané de type syndrome de sézary (461). La voie de TNFR2 est également directement impliquée dans le développement d'autres cancers (462,463). Chez

l'homme un taux élevé de TNFR2, soluble ou non est associé à un mauvais pronostic dans de nombreux cancer (464,465).

Pour ces raisons, le blocage du TNFR2 semble prometteur en immunothérapie (460). Les anticorps agonistes sont notamment efficaces dans des modèles murins de lymphome B ou de cancer du colon (466,467). In vitro chez l'homme, l'ajout d'un antagoniste de TNFR2 à la culture de cellules CD4⁺ issu de patients atteints de syndrome de sezary a permis de réduire la charge tumorale (LT CD4⁺ TCR Vβ) et modifier significativement le rapport LT effecteurs/Treg en faveur des LT effecteurs en favorisant la prolifération des premiers et en inhibant les seconds (468). Néanmoins, dans des modèles murins syngéniques, l'Ac Y9, agoniste de TNFR2, réduit la croissance tumorale de plusieurs lignées cellulaires, et agit en synergie avec le traitement par anti-PD-1 (469). . Ces données contradictoires soulignent la nécessité d'une meilleure compréhension de l'expression et des mécanismes d'action du TNFR2.

D. Modulation du métabolisme des LT par la voie CD39/CD73/A2A-BR

La voie CD39/CD73/récepteurs à l'adénosine A2AR/A2BR émerge comme suppresseur majeur des réponses immunitaires, en particulier dans le contexte tumoral (470). L'ecto-enzyme CD39 hydrolyse l'ATP en adénosine diphosphate (ADP) puis en adénosine monophosphate (AMP) (470). C'est ensuite l'ecto-enzyme CD73 qui hydrolyse l'AMP en adénosine (470). Elle-même inhibe l'activation de nombreuses cellules pro inflammatoires immunitaires dont les DC, le LT effecteurs et les NK et favorise les cellules immunosuppressives telles que les Treg et les macrophages M2 (470). Elle permet d'atténuer l'inflammation et de prévenir l'auto-immunité, et semble également favoriser la croissance tumorale (471). La délétion génétique de A2AR, l'un des récepteurs de l'adénosine, dans des modèles murins de mélanome (CL8-1) et de lymphome T (RMA) entraîne un rejet des tumeurs chez 60% des souris (472). De même dans un modèle murin de sarcome, un traitement par antagoniste d'A2AR améliore le traitement par transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifique de la tumeur (472).

CD39 et CD73 sont fortement exprimés par les Treg murins (seul CD39 est généralement retrouvé sur les Treg humains), contribuant à l'activité pro-tumorale de ces cellules (473). CD73 est normalement exprimé par les cellules endothéliales et par des sous-ensembles de LT, LB, DC, fibroblastes et de cellules épithéliales (474). L'expression de CD39 et CD73 est retrouvée dans de nombreux cancers humains et notamment sur les cellules tumorales dans les cancers métastatiques (475,476)

Dans les modèles murins de différents cancers, la croissance de la tumeur primitive et des métastases est réduite chez les souris CD39 et CD73 KO par rapport au souris sauvages (477–479). Ces phénotypes semblent reposer sur une baisse de la suppression des NK et LT effecteurs, par les Treg. L'inhibition de CD39 et CD73 par anticorps bloquant réduit, dans les modèles de cancer de souris, la croissance et la progression métastatique à la fois à travers le ciblage des cellules immunitaires mais aussi des cellules tumorales (480,481). Le blocage d'un ou des deux récepteurs favorise la réponse aux anti-PD-1 et anti-CTLA-4 (482,483).

Ces résultats précliniques ont conduit à la mise en place d'essais cliniques de phase précoce chez l'homme, actuellement en cours, étudiant des petits molécules ou des AcM bloquant CD39, CD73 ou leur ligand en association entre elles ou avec d'autres immunothérapies ou d'autres thérapies (476). Des premiers résultats ont été obtenus pour 2 antagonistes de l'A2A, en association ou non à un anti-PD-1 ou anti-PD-L1 permettant de confirmer leur dose maximale et leur innocuité notamment dans les CPNPC et les cancers de la prostate métastatiques (484,485).

E. Spécificité d'expression des checkpoints et efficacité thérapeutique

Comme nous l'avons vu, la majorité des récepteurs de surface décrits ci-dessus sont en fait des marqueurs génériques consécutifs à la stimulation des cellules ou parfois constitutivement exprimés. Leur pattern d'expression est donc large et partagé entre différents sous-types cellulaires. Ce manque de spécificité explique probablement en partie l'effet thérapeutique limité de certains anticorps, ainsi que certains effets secondaires toxiques, voire parfois des hyper-progressions sous immunothérapie ; comme montré avec les anti-PD-1, pouvant entraîner une augmentation de prolifération des Treg PD-1⁺ (486,487). La description et la compréhension de ces patterns d'expression sont donc une clé au développement efficace des immunothérapies, et mon travail de thèse s'est notamment concentré sur cet aspect dans le lymphome T.

Tableau 2. Expression simplifiée par les cellules immunitaires des checkpoints.

Abréviations :LT, lymphocyte T ; LB, Lymphocytes B ; NK, cellule Natural Killer ; DC, dendritic cell ; PD-1, Programmed cell death protein 1 ; CTLA-4, Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein ; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3 ; LAG-3, Lymphocyte-activation gene 3 ; TIGIT, T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains ; ICOS, Inducible T-cell COStimulator ; DNAM-1, DNAX accessory molecule-1 ; TNFR, tumor necrosis factor receptor.

Checkpoint	Expression				
	LT naïfs	LT activé/mémoire	LT régulateur	LT épuisé	Autres cellules immunitaires
CTLA-4	-	+	+++	++	
PD-1	-	+	+	+++	LB activé
ICOS	-	+	+++	+	
TIM-3	-	+	+	+++	LB NK Monocyte/macrophage
LAG-3	-	+	+	+	NK DCp
TIGIT	-	+	+	+	NK
DNAM-1	+	+	+	-	NK DC
OX40	-	+	+	-	NK Monocyte/macrophage
4.1BB	-	+	+++	-	LB activé
TNFR2	-	+	+++	-	Monocyte/macrophage

F. Autres thérapies basées sur les LT : CAR T-cells et Ac bispécifiques

D'autres thérapies telles que les thérapies cellulaires utilisent également cette compréhension du fonctionnement des LT, avec les CAR T-cells par exemple (488). Il s'agit de LT exprimant un récepteur antigénique chimérique qui reconnaît un antigène tumoral donné et dont les domaines intracellulaires contiennent à la fois le CD3 ζ et les domaines ITAM de CD28 ou 4-1BB (488). Les CAR T-cells anti-CD19 montrent des résultats très importants dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) B et les lymphomes B. Dans le DLBCL trois d'entre eux ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) après 2 lignes de traitement devant leur taux de réponse globale (TRG) (52 à 82%) et de réponse complète (RC) (40 à 54%) important, et 2 d'entre eux ont également montré leur supériorité par rapport au traitement standard de 2^{ème} ligne (489). Ces traitements peuvent encore être optimisés par notamment la combinaison d'inhibiteurs de checkpoints immunitaires, comme les anti-PD-1 afin de lever leur épuisement (490,491), l'utilisation de CAR T conventionnelles moins sensibles à l'épuisement, ou de CAR-NK cells (209).

Les Anticorps bispécifiques ciblant d'un côté un antigène tumoral et de l'autre côté le CD3 afin d'engager les LT effecteurs, tels que le blinatumomab (anti CD19/CD3) (492), l'Epcoritamab (493)

et le Glofitamab (494) ont des résultats très intéressants dans les lymphomes B. Ainsi l'Epcoritamab et le Glofitamab en monothérapie permettent l'obtention de 39% de RC chez des patients en rechute ou réfractaires.

III. Paysage immunitaire et immunothérapie des PTCL

Comme nous avons pu le voir ci-avant, la compréhension des mécanismes d'échappement des tumeurs au système immunitaire, mais également la description de la distribution et du phénotype des cellules immunitaires, ont été essentielles au développement des immunothérapies dans les tumeurs solides et certaines hémopathies malignes. Néanmoins, les lymphomes T, notamment nodaux, sont encore très mal compris à ces différents niveaux.

A. Composition et impact de la réponse immunitaire dans le PTCL.

Il existe quelques arguments en faveur d'une contribution du microenvironnement dans l'évolution des PTCL, d'une activation immunitaire anormale et de réponses défectueuses des LT. Ainsi l'accumulation de monocytes et les macrophages immunosuppresseurs de type M2 CD163⁺ sont associés à un pronostic défavorable (83,84). Dans les AITL, une forte proportion de LB dans les ganglions touchés, mesurée par cytométrie en flux, est de bon pronostic (495). Ceci a été confirmé dans une étude de transcriptome en bulk dans le PTCL-NOS (496).

Peut-être du fait de l'identité de la cellule tumorale dans le PTCL (elle-même un LT), le rôle et le phénotype des sous-populations T sont très peu décrits. De façon surprenante, un ratio CD4⁺/CD8⁺ élevé semble corrélérer à un bon pronostic, une forte quantité de CD8⁺ semblant même être associée à un microenvironnement immunosuppresseur dans les AITL (495,497). La valeur pronostique des Treg eux-mêmes, pourtant délétères dans la très grande majorité des cancers, est débattue dans le PTCL (498,499).

Une étude récente utilisant les approches de cytométrie de masse (CyTOF) et de séquençage ARN à l'échelle de la cellule unique (scRNA-seq) a montré l'expression de marqueurs d'épuisement par les LT CD8⁺ infiltrant les PTCL, notamment une forte proportion de cellules PD-1⁺TIGIT⁺, ainsi que des perturbations dans le compartiments des LB des patients (500). Toutefois, les conclusions de cet article doivent être nuancées par la faible taille d'échantillon et la variabilité des échantillons (ganglions, rate ou sang, collectés au diagnostic et en rechute de traitement...)

Il semble donc important de décrire de manière plus approfondie le phénotype des cellules immunitaires infiltrant les PTCL et notamment des LT pathogéniques et « normaux » afin de comprendre les dysfonctions immunitaires et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

B. Immunothérapies dans le PTCL

Tout d'abord les AcM visant des antigènes tumoraux le CD30, CD52, CCR4, CD25 ou CD4 semblent être intéressants en cas de PTCL en R/R mais à l'heure actuelle seul le Brentuximab Vedotin semble avoir un intérêt en 1^{ère} ligne (25,501–504). Ainsi comme nous en avons discuté l'ajout du Brentuximab Vedotin au CHP (CHOP sans vincristine), en première ligne dans les PTCL exprimant le CD30, dans l'étude ECHELON-2 permettait d'améliorer significativement la SSP par rapport au CHOP (25). Cependant la majorité des patients présentaient un lymphome T anaplasique et la puissance de l'essai était insuffisante pour comparer l'efficacité en fonction du sous-type histologique (25). L'analyse des essais européens de phase III ACT-1 et ACT-2 comparant 6 cures de CHOP vs 6 cures de CHOP associées à l'Alemtuzumab (anticorps monoclonal anti-CD52) sur les 252 patients atteints de PTCL (33% AITL ; 34% PTCL-NOS ; 33% autres) en 1^{ère} ligne, a montré une supériorité sur le nombre de RC mais avec une augmentation des toxicités et sans amélioration de la SSP et la SG (505,506).

Les AcM ciblant les molécules costimulatrice ou checkpoints inhibiteurs ont été testés dans les PTCL. De par la nature des PTCL, il est important de noter que ces agents peuvent à la fois cibler le microenvironnement immunitaire et les cellules tumorales.

Comme nous l'avons discuté les cellules tumorales des PTCL TFH sont apparentées au LT TFH, or ICOS joue un rôle crucial pour ces LT d'où son intérêt en thérapeutique. Ainsi l'AcM antagoniste d'ICOS, MEDI-570, a permis dans un essai de phase 1 dans les PTCL-TFH en R/R un TRG de 30% avec 7 réponses objectives sur les 23 patients inclus dont 2 RC (507).

L'axe PD1/PD-L1 est important pour les LT TFH mais également dans l'échappement immunitaire, d'où son impact possiblement à double tranchant. Ainsi les résultats des traitements ciblant cette voie sont très controversés. Dans les modèles précliniques certaines études rapportent des résultats encourageant lorsque d'autres constatent des hyperprogressions (64,508). Cette dualité est également vérifiée en clinique. En effet les effets du Pembrolizumab ont montré une activité modeste chez 18 patients présentant un PTCL en R/R avec un TRG à 33%, dont 4 RC (27%) et une médiane de SSP et de SG respectivement de 3.2 mois et 10.6 mois (509). Son association à la Romidepsine chez 20 patients présentant un PTCL en R/R permettait l'obtention d'un TRG de 50% (AITL, PTCL de type

TFH et ALCL) dont 8 patients (40%) en RC et 2 patients (10%) en RP (510). Sur les 8 patients en RC, 4 avaient arrêté le traitement depuis plus d'un an sans présenter de rechute et 2, toujours en traitement, étaient en RC depuis plus de 2 ans. La première étude ne retrouvait pas de corrélation entre la réponse au traitement et l'expression de PD-1 ou de PD-L1, tandis que dans la 2ème le niveau d'expression de PD-L1 était significativement plus élevée dans le groupe RC vs Réponse partielle ou maladie stable (509,510). En revanche, dans un essai de phase II, un traitement par Nivolumab chez 12 PTCL en R/R a entraîné une hyperprogression (progression spectaculaire suivant le 1er cycle de traitement) chez 4 patients (33%) motivant l'arrêt de l'essai (511).

Concernant les autres inhibiteurs de checkpoint, un anti-CTLA4 tel que l'Ipilimumab pourrait être proposé dans le cas de la présence d'une fusion CTLA4-CD28, induisant des signaux hyperactifs, parfois retrouvés dans les AITL (512).

Les résultats des traitements par CAR T-cells sont beaucoup plus limités que dans les lymphomes B du fait du problème du choix de la cible, et du risque de cibler également les cellules T normales, de l'aplasie des cellules T normales et de la contamination du prélèvement (pour modification) par des cellules T malignes (104,488). Des solutions pour pallier à ces problèmes sont à l'étude (104,488,513,514) : utilisation de CAR NK ; utilisation de CAR T-cells à durée de vie et activité limitée ou modulable ; cible antigénique restreinte à un domaine de la chaîne β du TCR ; utilisation de cellules allogéniques. Il existe néanmoins des études précliniques et cliniques prometteuses, avec notamment un modèle murin de CAR T CD30 (515). Une étude de phase I a testé le CAR T CD5 chez 9 patients présentant une LAL T ou un LNH T (516). Le traitement a été bien toléré sans syndrome de relargage des cytokines ou neurotoxicité de grade ≥ 3 et le TRG était de 44% (n=4) avec 3 RC dont 1 AITL et 1 PTCL autre.

C. Préambule aux résultats

Les différents points abordés dans cette introduction mettent en évidence la révolution de l'immuno-oncologie et des immunothérapies au cours des dernières décennies, mais également le manque de connaissances dans ces domaines, dans le contexte des PTCL. Au cours de ma thèse, je me suis ainsi attaché à décrypter la distribution et le phénotype de certaines sous-populations immunitaires dans ces pathologies.

Objectifs du travail de thèse

Objectifs du travail de thèse

Nous avons élaboré ce projet de thèse au cours de l'année 2020. Avec mon directeur de thèse, nous avons décidé d'associer nos connaissances sur les réponses immunitaires de son côté, et sur les hémopathies malignes du mien. Nous sommes partis d'une nécessité clinique : la prise en charge des AITL et des PTCL-NOS, 2 entités les plus fréquentes des PTCL, est peu satisfaisante, avec des traitements de référence (chimiothérapie, auto/allogreffes...) encore imparfaits (3,4,6). D'autre part, la relation entre le microenvironnement immunitaire « sain » et la progression des PTCL était encore peu étudiée, et notamment la balance entre l'engagement de molécules de co-stimulation activatrices et inhibitrices qui semble dicter la fonction des lymphocytes et la progression tumorale dans de nombreux cancers solides (329,517). A cette époque, il était simplement décrit une accumulation de macrophages de type « suppresseur » et une possible suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale via l'expression de cytokines et de récepteurs inhibiteurs par les cellules malignes, tel que PD-1/PD-L1 dans les AITL et les PTCL-NOS (83,84,518). Cependant les essais cliniques à base d'immunothérapie n'étaient pas probants, avec notamment des constatations d'hyperprogression sous anti-PD-1 (511).

Dans ce contexte, il nous semblait crucial d'obtenir une cartographie détaillée du microenvironnement immunitaire des AITL et des PTCL-NOS afin de révéler un potentiel impact du système immunitaire sur la progression tumorale et de mettre en évidence de possibles cibles thérapeutiques d'immuno-modulation.

En Février 2020, le Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon s'est équipé d'un cytomètre spectral Aurora (Cytek). Cette technologie de pointe nous offrait la possibilité d'étudier avec un niveau de détails incomparable, et sur un nombre de cellules limité, le microenvironnement des PTCL. J'ai donc élaboré un panel d'analyse de 33 paramètres simultanément, allant de l'identification des sous-populations immunitaires aux marqueurs témoignant de l'état d'activation ou d'inhibition des lymphocytes. Nous avons établi des collaborations avec les services d'hématologie clinique, d'anatomopathologie et du CRB du CHU de Lyon Sud et l'Institut Carnot CALYM (Projet de collection CeVi et TENOMIC) permettant la constitution d'une cohorte de prélèvements de cellules en suspension d'AITL et de PTCL-NOS. Les analyses bioinformatiques et biostatistiques avaient pour but de décrire avec finesse la distribution et le phénotype des cellules immunitaires et d'identifier de potentiels marqueurs pronostiques et cibles thérapeutiques.

Ensuite, afin d'étudier la valeur pronostique des checkpoints alors identifiés nous avons pour but d'évaluer leur niveau d'expression ainsi que leur impact, sur une large cohorte rétrospective d'échantillons d'AITL de patients via l'utilisation de l'immunofluorescence multiparamétrique.

Enfin, pour valider le potentiel thérapeutique des cibles identifiées nous souhaitons effectuer des mesures de cytotoxicité anti-tumorale in vitro permettant d'évaluer l'effet de l'activation ou de l'inhibition de ces cibles sur les cellules tumorales et les cellules immunitaires.

Dans un second temps, mon travail ayant validé la faisabilité et l'utilité de l'approche de cytométrie spectrale que j'avais développée pour l'étude du TME dans les hémopathies, j'ai également voulu l'appliquer à l'étude des réponses T dans la LLC chez des patients traités par Ibrutinib (inhibiteur de BTK).

Article 1 : Deep phenotyping of nodal
T-cell lymphomas unravels immune
alterations and therapeutic targets
(Soumis dans leukemia : September
2023)

Deep phenotyping of nodal T-cell lymphomas reveals immune alterations and therapeutic targets

Pierre Stephan¹, Jimmy Perrot², Allison Voisin¹, Thibault Andrieu¹, Maxime Grimont¹, Julie Caramel¹, Mathilde Bardou², Garance Tondeur², Edoardo Missiaglia³, Philippe Gaulard⁴, François Lemmonier⁴, Laurence de Leval³, Emmanuel Bachy^{2,5}, Laurent Genestier⁵, Alexandra Traverse-Glehen², Yenkel Grinberg-Bleyer^{1,*}

¹ Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Labex DEV2CAN, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

² Centre Hospitalier Lyon Sud and Université Claude Bernard Lyon-1, Pierre- Bénite, France.

³ Institute of Pathology, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Lausanne University Hospital and Lausanne University, Lausanne, Switzerland.

⁴ AP-HP, Henri Mondor Hospital, Pathology Department, Créteil, France; University Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Créteil, France.

⁵ Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Team Lymphoma Immuno-Biology, UMR INSERM U1111, CNRS 5308, Université Claude Bernard Lyon I, ENS de Lyon, Lyon, France.

*Corresponding author : yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr

Abstract

Whereas immunotherapies have revolutionized the treatment of different solid and hematological cancers, their benefit in nodal peripheral T-cell lymphomas (PTCL) is to date limited. Characterizing the immune tumor microenvironment (TME) of PTCLs therefore carries great therapeutic interest. Here we analyzed the distribution and phenotype of immune cells in angioimmunoblastic T-cell lymphomas (AITL) and PCTL, not otherwise specified (PTCL, NOS) patients. Spectral flow cytometry analyses illustrated deep alterations in immune cell compartments and suggested in particular an impaired function of cytotoxic T cells. In addition, we observed a general upregulation of CD39 expression at the surface of most immune cells. Retrospective analyses demonstrated a strong association between high CD39 expression by T cells and poor patient prognosis. Together, our study

provides a useful resource to understand the complex TME of nodal PTCLs and highlights a novel prognostic factor and putative therapeutic target.

Competing interest statement : The authors have no competing interest to disclose.

Introduction

PTCL are highly heterogeneous neoplasms derived from post-thymic T cells or mature Natural Killer (NK) cells, and represent 10% to 15% of non-Hodgkin lymphomas ¹. The two most common subtypes in Western countries are angioimmunoblastic T-cell lymphomas (AITL) and PTCL, NOS. Malignant cells in AITL are predominantly CD4⁺CD8⁻ and characterized by the expression of T follicular helper cells (TFH) markers such as ICOS or PD-1 ². PTCL-NOS display heterogeneous phenotypes that do not match any other category and represent about 20% of PTCLs ³. Despite advances in the understanding and classification of these neoplasms over the past decades their prognosis remains poor, with a 5-year overall survival (OS) around 30%, fostering the need to identify new therapeutic targets.

Extensive literature in the past decades has highlighted the tight link between immunity and cancer ⁴. In many solid tumors, high infiltration of cytotoxic CD8⁺ T cells has been associated with better outcomes ⁵. However, cancers have developed a myriad of strategies to counterbalance recognition and elimination by T cells, among which the engagement of inhibitory receptors on the surface of T cells that can drive an exhaustion program ⁶. Unravelling this process led to the development of CTLA-4 and PD-1-immune checkpoint-blockade therapies that have revolutionized cancer care by improving T-cell responses to cancer ⁷.

PD-1/PD-L1 blocking agents have been successfully used in some hematological malignancies, with an impressive response rate in classical Hodgkin lymphoma ^{8,9}. However, the clinical benefits of such agents in nodal PTCL are relatively modest ^{10,11}. In addition, several cases of hyperprogression have been reported in patients with different PTCLs^{10,12}. The mechanism underlying this phenotype was nicely documented in mice, in which PD-1 expressed by malignant T cells acted as a cell-intrinsic tumor suppressor ¹³. In addition, it was proposed in solid cancers, that PD-1 expression by

immunosuppressive Forkhead box protein P3 (Foxp3)⁺ regulatory T cells may unleash their proliferation, subsequently promoting tumor growth ¹⁴.

Transposing checkpoint-blockade-based immunotherapies to nodal PTCLs, has been hindered by our poor understanding of the types and phenotypes of immune responses to these tumors, though evidence points toward a strong contribution of the microenvironment to their progression. For instance, monocytes as well as immunosuppressive CD163⁺ macrophages were suggested to promote disease worsening ^{15, 16}. Bulk RNA-seq analyses on nodal PTCLs suggested that high frequencies of B cells and dendritic cells (DCs) were associated with better survival ¹⁷. Moreover, T cell-subsets are also modulated in nodal PTCLs. As in many solid cancers, a high CD8/CD4 ratio seems to confer good prognosis ¹⁸, although these findings were recently challenged ¹⁹. Whereas the accumulation of Treg cells in solid tumors is generally of poor prognosis, this does not seem to be the case in PTCL, and it was even suggested that the proportion of Treg cells could be lower in AITL lymph nodes when compared to non-infiltrated reactive lymph nodes ^{20,21}. A recent study using Cytof and scRNA-seq approaches revealed expression of exhaustion markers by tumor-infiltrating CD8⁺ T cells, as well as perturbations in the B-cell compartment of patients with AITL ²². Together, these data illustrate the correlation between an altered immune response and the progression of PTCLs.

We herein performed a proteomic analysis of T, B and NK cell subsets in AITL and PTCL, NOS samples, using spectral flow cytometry. We observed profound alterations in the B and T-cell compartments when compared to non-tumor tissues. We highlight the aberrant expression of numerous surface receptors on malignant and healthy cells, suggesting in particular a state of T-cell exhaustion reflecting immune suppression in the TME. In addition, we show a generalized upregulation of CD39 at the surface, and associate high CD39 expression with poor survival.

Material and methods

Samples for spectral flow cytometry analyses

Frozen PTCL suspensions, collected at diagnosis, were obtained through the CeVi_Collection Project from the CALYM Carnot Institute, funded by the French National Research Council. Samples were collected as part of a RIPH3 project (ID RCB 2020-A02273-36 validated by the CPP Ile de France V on November 26, 2020 n°20.07.28.49748) for which adult patients (≥ 18) were informed by written

consent. The clinical and biological data of the patients were collected retrospectively. Their characteristics are presented in Supplementary Tables 1 and 2.

Blood samples from healthy volunteers were obtained through the Etablissement Français du Sang (EFS). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation and red blood cells were lysed with Ammonium-Chloride-Potassium lysis Buffer. Tonsils obtained anonymously from patients that underwent tonsillectomy were used as a control (Clinique du Parc, Lyon, agreement #1A16502305468). Tonsils were reduced to cell suspensions by mechanical disruption followed by enzymatic digestion with 2 mg/mL collagenase-D (Roche) 20 U/mL DNase (Sigma). The resulting cell suspensions were filtered, washed and frozen.

Samples for multi-IF analyses

Tissue blocks of formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) AITL samples collected at diagnosis, were obtained from the department of Pathology at the Lyon Sud Hospital. This study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki. Patients had provided an informed consent for use of specimens and baseline and prospective clinical data for research purposes. The study was approved by the local ethics committee (MR-004 #23-5211). Clinical and biological data of the patients were collected retrospectively. Summary of the data is presented in Supplementary Table 3.

Flow cytometry

After thawing in a water bath at 37°C, the cell suspensions were washed in RPMI 1640 W/HEPES W/GLUTAMAX-I (supplemented with 10% FBS; Penicillin/Streptomycin; Non-Essential Amino Acids; Sodium Pyruvate and β -Mercaptoethanol, all from Thermo Fisher). 1 million cells per sample were stained with viability dye for 15 min at room temperature (RT), then incubated with Human FC block for 10 min at RT. Cells were then incubated with CXCR5 antibody mix in FACS buffer (PBS1X with 2.5 mM EDTA and 3% FBS) for 20 min at 37°C, then with surface marker antibodies mixed in FACS buffer and brilliant stain buffer (BD) for 30 min at RT in the dark. Cells were then fixed and permeabilized using the eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Cells were finally incubated with intracellular marker antibodies mix for 20 min at 4°C. The complete list of antibodies and their final concentration

can be found in Supplementary Table 4. Acquisition was performed on an Aurora Spectral Cytometer (Cytek). Analyses were done using the OMIQ software from Dotmatics (www.omiq.ai).

Tissue micro-arrays and multi-IF protocol

Representative tumor areas were selected on H&E slides by an experienced pathologist. TMA blocks were generated by punching 1 mm cores from FFPE tissue samples using a Tissue Arrayer MiniCore instrument with TMA Designer® 2 Software from ALPHELYS. Three 1 mm cores were taken from each patient sample. The three-plex mIF assay was first optimized as previously described²³. The standard seven-color TSA protocol template on the BOND RXm was used with modifications. TMAs underwent an initial antigen retrieval step of ER1 at 100°C for 20 min, a dispensing of the TSA reagents (incubation time of 30 min), and DAPI staining at a volume of 150 µL for 5 min. The following sequence was used: anti-CD3+OPAL 570 (position 3), anti-CD8+OPAL 520 (position 4), anti-CD39+OPAL 690 (position 5). All antibodies were diluted using Akoya's antibody diluent/blocking buffer.

Multi IF data acquisition and processing

Slides were imaged using the Vectra Polaris spectral imaging system (Perkin Elmer) at 20X or 40X for TMA. Scans were visualized with the Phenochart software where autofluorescence can be directly removed.

TMA cores were excluded if one of the following criteria was present: large part or whole of core lost; poor quality staining; or widespread necrosis. Cell phenotypes could be analyzed in the 43 patients. In 6 of them, it was evaluated in one TMA core. For the others, the results retained for each patient were the median of the 2 or 3 TMA cores. Images were spectrally separated with a synthetic algorithm in InForm version 2.4.8 (Akoya Biosciences). Cell phenotypes were identified and counted using image analysis in InForm. Six TMA cores representing the heterogeneous nature of AITL, were selected to train machine learning algorithms for tissue segmentation, cell segmentation and cell phenotyping. First, the tissue was divided into tumor or non-tumor compartments using the tissue segmentation setting by drawing different areas as different categories. Then, cell segmentation was performed using DAPI counterstaining, using the adaptive cell segmentation setting in InForm software. The splitting parameter was adjusted to segment crowded and overlapping cells. Membrane

staining was selected to assist in nuclear segmentation. Seven cell phenotypes were analyzed: total T lymphocytes (CD3⁺), CD8⁺ T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺), non-CD8⁺ T lymphocytes (CD3⁺CD8⁻), total cells expressing CD39 (CD39⁺), total T lymphocytes expressing CD39 (CD3⁺CD39⁺), CD8⁺ T lymphocytes expressing CD39 (CD3⁺CD8⁺CD39⁺) and non-CD8⁺ T lymphocytes expressing CD39 (CD3⁺CD8⁻CD39⁺). When the training was completed, it was applied to a set of cases to verify that it was working properly. These parameters were then applied to all TMA cores and the percentage of cells according to their phenotypes was calculated using the R version 4.2.1 software.

Statistical analyses

Statistics were performed using GraphPad Prism Software v9 and R version 4.2.1. For FACS data, Kruskal-Wallis or 2-way AONVA tests were used, unless mentioned otherwise. Statistical analyses for comparison between clusters established by the FlowSOM algorithm, were done using the edgeR package. PFS was calculated from the date of diagnosis to the date of progression, relapse, or death from any cause. OS was calculated from the date of diagnosis to the date of death from any cause. Survival estimates were calculated with the Kaplan-Meier method. Survival distributions were compared with the log-rank test, and Cox proportional hazard regression models were used to estimate hazard ratios and associated 95% confidence intervals.

Results

PTCL-specific immune cell populations identified through deep immunophenotyping

To document immune phenotypes associated with PTCL, we designed a 33-color flow cytometry panel to identify different innate and adaptive subsets in a single tube, namely DCs, macrophages, NK and B cells, and a number of markers to distinguish subsets of T cells. Moreover, activation, proliferation and exhaustion of these populations were determined using different intracellular and surface markers (Table 1). We applied this immunophenotyping panel to lymph node (LN) cell suspensions obtained from 18 PTCL patients at diagnosis (Tables S1 and S2), as well as 5 tonsil samples and 5 peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples obtained from healthy donors. Of note, progression-free survival (PFS) and OS in the cohort corroborated previous reports (Figure S1A).

To identify disease-specific cell populations, we first normalized the data to attenuate the batch effect, concatenated all lymphoid tissue (tumoral LN and non-tumoral tonsil) samples and carried out a series of unsupervised analyses. PBMCs were not included in these analyses to avoid major changes in cell-type distribution (data not shown). Two-dimensional reduction through Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) and computer-driven clustering through FlowSOM conducted on cell type markers (CD3, CD4, CD8, CD56, TCR $\gamma\delta$, CD163, CD11c, CD20), identified 18 clusters, corresponding to classical immune lineages (T cells, NK cells, B cells, macrophages, DCs), as well as several aberrant phenotypes such as CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (cluster #7) and CD3⁺CD4⁺CD20⁺ (#12) cells that were abundant in individual patients and likely corresponded to neoplastic cells (Figure 1A, B). Interestingly, this unsupervised analysis revealed a clear distinction between PTCL and tonsil samples (Figure 1C-D). Specifically, we detected a strong decrease in B cell-clusters (#11, 13,17) in PTCL samples, while CD4⁺ and CD8⁺ T cell clusters (#1,2,4-6) and NK cells (#14) and DCs (#9) were higher in both AITL and PTCL-NOS samples (Figure 1B and Figure S1B). Only two patient-specific clusters were differentially represented between NOS and AITL samples (#7, CD3⁺CD4⁻CD8⁻ in 2 NOS patients and #12, CD3⁺CD4⁺CD20⁺ in 1 AITL patient) (Figure S1B), indicating that although the distribution of major immune types was largely impacted in nodal PTCL compared to tonsil, the two types of PTCL were very close. This observation was largely confirmed using supervised analyses based on traditional manual gating, with increased T cells and DCs at the expense of B cells (Figure 1E, F). Of note, NK cells (CD7⁺CD56⁺) were slightly more abundant without reaching statistical significance. In line with these perturbations, we found that the proportion of Ki67⁺ cycling B cells was significantly reduced in PTCL-NOS patients (Figure S1C). This was not the case in AITL samples, likely because TFH features of tumor cells enhance B-cell activation, maturation and proliferation²⁴. In addition, despite important variability, we observed a trend toward enhanced proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, but not NK cells (Figure S1C).

Analysis of CD4⁺ T-cell subsets in PTCL

We next examined the distribution and phenotype of specific immune cell subsets, initially focusing on putative tumor cells. Based on histological evaluation at diagnosis (Table S2), all patients of our AITL cohort displayed a CD3⁺CD4⁺CD8⁻ Foxp3⁻ tumor cell phenotype. This was not the case for

PTCL-NOS patients, that included two CD3⁺CD4⁺CD8⁻ patients (Figure 1B and Table S2). Therefore, we analyzed in more details the features of CD4⁺Foxp3⁻ conventional (Tconv) cells, that contained both transformed and normal cells, in AITL and tonsils. Despite large variability between patients, the proportion of Tconv cells was higher in AITL patients, ranging from 9% to 51% of total live cells (Figure 2A). To characterize the phenotype of these cells, we used UMAP and FlowSOM algorithms with T-cell markers, proliferation/activation proteins and checkpoint receptors as variables (Figure 2B). Cells were highly activated in all samples, with only a minority of CD45RA⁺ cells (Figure 2C). 25 clusters were identified, corresponding to cells expressing divergent levels of CD7/CD10, Ki67 and many checkpoints, starting with TFH markers, such as ICOS and PD-1. Strikingly, AITL and tonsils were clearly separated on the UMAP, highlighting that transformation deeply impacted the Tconv cell phenotype (Figure 2D). Indeed, tonsils harbored significantly more classical CD7⁺PD-1⁺ICOS⁺CXCR5⁺ TFH cells than AITL (Clusters #17,20,23,25), whereas tumor samples comprised discrete and specific phenotypes, including CD10⁺ and/or CD7⁻ cells as expected, but also showing high expression of Tim3 (cluster # 11), LAG-3 (cluster #9), or OX-40 (cluster #14), while expression of CTLA-4 or TIGIT was more heterogeneous (Figure 2C). Interestingly, some clusters were limited to a subset of patients, revealing patient-specific phenotypes (Figure 2E, Figure S3A, B). Ki67⁺ cycling cells (clusters #5 and 9) were also enriched in AITL samples. ICOS and PD-1 were strongly expressed as expected, and further analysis through manual gating showed that their expression did not differ significantly from that of non-tumoral tonsils, with >50% cells expressing ICOS, PD-1 or both (Figure 2F). Thus, in addition to TFH markers widely used for diagnosis purpose, we show that AITL cells adopt a highly activated state, often characterized by heterogeneous expression of different checkpoint molecules.

Foxp3⁺ Treg cells are critical inhibitors of anti-tumor immunity. We detected a significant increase in the proportion of Treg cells among CD4⁺ T cells in both AITL and PTCL-NOS compared to tonsil samples (Figure S4A). Based on classical activation markers and Treg cell hallmarks, 6 cell clusters were identified through FlowSOM, corresponding to CD45RA⁺ naïve (cluster #4), PD1⁺ICOS⁺ TFR-like (#5), CD39^{bright}TIGIT^{hi} (#2) cells, as well as a subset with high expression of multiple Treg markers (#1) (Figure S4B-D). Cluster #6 was specific to patient PTCL-NOS #11 (Figure S4E). Of those

populations, we only found decreased proportions of naïve-like TCF1⁺CD45RA⁺ cells in AITL when compared to the other samples; this was confirmed through supervised analysis (Figure S4F). Collectively, Treg cells were abundant in PTCL and exhibited a high activation profile, suggesting active immunosuppression.

NK cell phenotype is not impaired in PTCL

NK cells are important effectors of the anti-tumor response; nevertheless, their activation and function is often dampened in cancer, constituting an important mechanism of immune escape. We analyzed the distribution and activation/maturation levels of CD56⁺ NK cells. Unsupervised analyses revealed 6 clusters that could be generally defined as CD56^{bright} cytokine-producing cells, CD57⁺ cytotoxic cells and Ki67⁺ proliferating cells (Figure S5A). These different populations were not significantly different between tonsils and PTCL LNs; this was confirmed through supervised analysis and manual gating (Figure S5B-D). Thus, the PTCL TME did not seem to impact NK cell distribution.

CD8⁺ T cells display features of exhaustion

Next, we examined the phenotype of CD8⁺ T cells in lymphoid tissues. FlowSOM analysis on 17 markers of activation highlighted 18 distinct cell clusters that corresponded to (i) CD45RA⁺ TCF1^{+/-} naïve-like cells, with low expression of checkpoint molecules (ii) Ki67⁺ proliferating cells, and (iii) CD45RA⁻ activated/memory cells with expression of at least 2 checkpoint receptors (Figure 3A-B). Differential expression analyses between subgroups of samples, highlighted the loss of naïve-like cells (CD45RA⁺TCF1⁺GzmB⁻) in both AITL and PTCL-NOS (clusters #13 and 17) compared to non-malignant tonsils (Figure 3B-E and Figure S6A). In contrast, Ki67⁺ cells increased (Figure S1D), and clusters# 1, 2, 3 and 9, corresponding to cell subsets with very strong co-expression of PD-1 and TIM-3 among other inhibitory receptors, were significantly enriched in tumor samples. Although variable, the total number of PD-1⁺TIM-3⁺ cells was higher in tumor cells compared to tonsils (Figure 3E). Of note, CD8⁺ T cell profiles were not strikingly different between AITL and PTCL-NOS patients, revealing common features of T-cell immunity between the two lymphoma subtypes (Figure 3C and Figure S6A). Unsupervised clustering efficiently distinguished tonsils from PTCL samples based exclusively on the phenotype of CD8⁺ T cells (Figure S6B). We further investigated the phenotype of these cells by performing Boolean analysis following manual gating, and observed a strong increase

in cells expressing at least 3 inhibitory receptors in tumor samples compared to healthy PBMCs and tonsils (Figure 3F). This exhausted phenotype, together with the expansion of Treg cells, suggest that a strong immune suppression takes place in PTCL lymph nodes, emphasizing the need for immunotherapeutic strategies in these conditions.

Differential expression of actionable receptors on immune cell subsets

We thus wondered whether our strategy may unveil actionable costimulatory molecules, *i.e.*, surface checkpoints with specific expression patterns in pro-tumoral subsets (Treg cells and Tconv cells containing tumor cells) versus anti-tumoral populations (CD8⁺ and NK cells). We first analyzed inhibitory checkpoints. As previously described²², PD-1 was broadly expressed (average of 40-60% positive cells) across subsets (NK cells being negative for this receptor, as shown in other contexts²⁵) (Figure 4), similarly to TIM-3 (9-57%) and TIGIT (30-70%). Conversely, LAG-3 was expressed by few cells and CTLA-4 was mostly found on Treg and Tconv cells (18-84% positive cells), while its expression was quite low on CD8⁺ T cells and NK cells; this was particularly true for AITL samples. In addition, NKG2A was expressed by about 50% of NK cells regardless of the pathology, and undetected on T cells. Concerning 'activation' checkpoints, ICOS and OX-40 followed a pattern similar to CTLA-4, whereas 4-1BB and TNFR2 displayed low expression, the latter being preferentially expressed by Treg cells. Thus, while checkpoint receptors were generally broadly expressed in PTCLs, some of these targetable proteins (CTLA-4, ICOS, OX-40) showed specific expression patterns with high expression in Tconv (including tumor cells) and Treg cells and low expression in anti-tumor effectors, indicating that they may be considered as therapeutic targets.

Increased CD39 expression in PTCL is associated with poor prognosis

In addition to these checkpoints, belonging to the CD28 and tumor necrosis factor receptor superfamilies, we also investigated the expression levels of the ectonucleotidase CD39. CD39 is a surface protein that has recently emerged as an important immune checkpoint in cancer, through its ability to convert ATP to AMP, ultimately leading to the production of the immunosuppressive nucleoside adenosine²⁶. While CD39 was mostly expressed by DC, B cells and NK cells in tonsils, it was expressed by some T cells in PTCL patients (Figure 5A-B). In CD8⁺ T cells, CD39 was largely enriched in activated cells compared to naïve cells, and to a higher extent, in exhausted T cells (Figure

S7A). We thus wondered whether CD39 expression impacted PTCL clinical outcome. First, we investigated the putative prognostic value of CD39 at the RNA level, in bulk samples, by examining the association between *ENTPD1* expression and OS in the TENOMIC cohort, that consists of a dataset of microarray-defined gene expression profiles of 85 samples of AITL patients. In this cohort, the level of *ENTPD1* expression in total cells was not significantly associated with a prognostic value (Figure S7B). To further explore the expression of CD39 at the protein level in T-cell subsets, we utilized a multi-immunofluorescence (IF) approach, using tissue microarrays (TMA) comprising 43 AITL samples at diagnosis, with a 10-year clinical history. PFS and OS in the cohort matched previously reported data (Figure S7C). Slides were stained for CD3, CD8, CD39 and DAPI and each population was determined. CD3⁺ T cells, in particular the CD8⁺ subset, exhibited higher CD39 expression compared to non-T cells. As in FACS analyses, we observed an important variability in CD39 expression between patients (Figure 5C, D). We first measured the impact of CD39 expression in different subsets by splitting the samples based on the median expression of CD39. Although the proportion of CD39⁺ cells among total cells was not associated with prognostic significance, patients harboring high CD39 expression among T cells (regardless of CD8 expression) showed a trend toward poorer prognosis (Figure 5E). To refine this analysis, we analyzed the data following Receiver Operating Characteristic (ROC) curve-based separation of patients. We found that patients harboring the highest expression of CD39 in T cells (n = 15, 35% of the whole cohort) exhibited a significantly poorer prognosis, both at the PFS and OS levels (Figure 5F). Similar conclusions could be reached when analyzing CD39 expression in the CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD8⁻ subsets (Figure S7D). The prognostic value of CD39 expression by T cells, was further confirmed through multivariate Cox models including Prognostic Index for AITL (PIAI), sex and age (Figure 5G). Together, our data suggest CD39 expression by T cells may represent a novel independent prognostic factor in AITL and should be explored as a putative target.

Discussion

To date, and at odds to many solid tumors and other hematological malignancies, there is a clear lack of knowledge in the distribution and phenotype of immune cells in the context of PTCLs. Our study

documents an accumulation of T cells -including non-tumoral CD8⁺ T cells and Treg cells- at the expense of B cells in this disease. Although this confirms recently reported data ²², this does not preclude the therapeutic targeting of B cells, as these can support tumor cells ^{27, 28}.

One striking observation that can be made based on our data is the large phenotypic heterogeneity of Tconv cells between AITL patients. Although most Tconv cells expressed at least one checkpoint surface receptor, only about half of them expressed PD-1 or ICOS, suggesting that the phenotype and biology of AITL cells extend beyond these 2 single markers. This deserves further exploration, for instance by combining high-dimensional cytometry to single-cell TCR-Seq that allows the identification of clonal cell populations. Most CD8⁺ T cells in both AITL and PTCL, NOS expressed at least one inhibitory checkpoint and a prominent PD-1⁺TIM3⁺ population could be detected, suggesting that an active exhaustion process might be taking place in PTCL tissues. This is in accordance with observations made in patients with cutaneous T-cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphomas ²⁹⁻³¹, and confirms the potential benefit of checkpoint-based immunotherapies in PTCL.

In this regard, we aimed at identifying surface receptors expressed by cytotoxic T cells and/or NK cells but not by malignant and Treg cells, or vice-versa. Similar to the large spectrum expression of PD-1 that may explain the hyperprogression detected in some patients following PD-1 blockade, we observed that TIGIT and TIM-3 were largely expressed by both tumor-promoting (tumor cells, Treg cells) and tumor-inhibiting (CD8⁺ T cells, NK cells) populations. This broad expression may negate the therapeutic potential of blocking antibodies that are currently under clinical development in solid and hematological malignancies ³². In contrast, other surface markers, such as OX-40, or to a lesser extent CTLA-4 or ICOS, displayed a much higher expression on CD4⁺ (comprising tumor cells and Treg cells) than other subsets. These may thus represent attractive therapeutic targets for the treatment of PTCL. In line with this, mRNA expression of *CTLA4* was shown to be associated with poor prognosis in a meta-analysis of PTCL transcriptomes³³. Specifically, this would require the use of depleting mAbs through the use of antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis - optimized IgG1 molecules ³⁴. To date and to our knowledge, OX-40 mAbs that are under development have agonistic functions and should not be recommended for the treatment of PTCL. The depleting

effect of current anti-CTLA-4 mAbs, such as Ipilimumab, is still largely debated and there is room for improvement³⁵⁻³⁷. Different strategies have been used to create anti-CTLA4 IgG1 mAbs with strong Treg-depleting properties and anti-tumor effects in preclinical models^{38, 39}, which deserve attention for the therapy of PTCL. MEDI-570, an afucosylated IgG1 anti-ICOS mAb, was shown to induce T-cell depletion in cynomolgus monkeys⁴⁰; a phase I trial gave positive signs of activity in AITL patients⁴¹. In addition to these T-cell-targeting agents, NKG2A also appears to be an interesting target in PTCL, as its expression was largely restricted to NK cells. As blocking anti-NKG2A mAbs are currently in clinical evaluation in solid cancers⁴², they may represent a future therapeutic avenue in PTCL.

In addition to these traditional immune checkpoints, our data highlights CD39 as a promising target in nodal PTCLs, both through its prognostic value and its potential therapeutic targeting. The combined action of CD39 and CD73 that lead to the production of adenosine, have been extensively described for their tumor-promoting functions in solid cancers²⁶. CD39 inhibition reinvigorates cytotoxic T-cell activity in preclinical models of melanoma or sarcoma among others⁴³. CD39 expression also increases in different hematological malignancies, including T-cell-derived cancers such as Adult T-cell leukemia/lymphoma or Sezary syndrome^{44, 45}. High expression of CD39 was shown to be associated with poor prognosis in Diffuse Large B-Cell Lymphoma and multiple myeloma^{46, 47}. CD39 expression on T cells is correlated with disease severity in patients with chronic lymphocytic leukemia^{48, 49}. Because of this association with tumor progression, the therapeutic potential of CD39 inhibition has largely been tested in blood cancers. For instance, antibodies targeting CD39 potentiate the therapeutic efficacy of T-cell transfer in a humanized model of B-cell lymphoma⁵⁰, whereas ARL67156 and POM-1, two ectonucleotidase inhibitors with high affinity for CD39, enhance T-cell function in follicular lymphoma and multiple myeloma patient samples; respectively^{47, 51}. CD73 or A2AR inhibition enhance non-tumoral T-cell proliferation in Sezary syndrome *in vitro*⁵². Our data now extend the tumor-promoting properties of CD39 to nodal PTCLs. We propose that CD39 expression could be assessed by immunohistochemistry and/or flow cytometry as a potent prognostic factor in AITL. Moreover, patients with PTCL may benefit from the CD39-blocking agents currently under clinical development for other cancers.

Acknowledgements

We thank the CeVi_Collection group : (<https://experts-recherche-lymphome.org/calym/explorer-les-ressources-du-consortium/collection-cevi/centres-participants-a-la-collection-cevi/>) from the CALYM Carnot Institute funded by the French National Research Council (ANR), for providing PTCL samples. We thank.”, Pierre Milpied, Pierre Sujobert, as well as all members of the lab, for helpful discussions on the project. This project was funded by grants from la Ligue contre le Cancer, the ATIP-Avenir funds, the Laboratory of excellence (LabEx) Dev2Can (ANR-10-LABX-0061). PS was supported by a scholarship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). AV was supported by a fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) Foundation.

Author contributions

PS and YGB conceptualized the project, collected and analyzed all data. PS, AV, TA designed, performed and analyzed FACS experiments. JP, MB, GC, designed and performed TMA and multi-IF experiments. MG and JC analyzed multi-IF experiments. EM analyzed the TENOMIC data. PG, FL, LDL, EB and ATG selected patients and confirmed the original diagnosis through pathological analyses. YGB wrote the paper and secured funding.

Data Availability Statement

All raw or analyzed data will be made available upon reasonable request.

Figure legends

Figure 1. Perturbations in immune cell subsets in PTCL tissues. Samples were stained for FACS and analyzed using unsupervised clustering (A-C) and traditional supervised gating (D) on total live cells. (A) UMAP visualization, FlowSOM distribution of clusters and projection of selected markers in concatenated samples (5 tonsils, 11 AITL, 7 PTCL-NOS). (B) Heatmap showing hierarchical clustering and expression of indicated markers in FlowSOM clusters, and their differential enrichment between groups. (C) Distribution of cells from each group on UMAP. (D) Heatmap showing unsupervised hierarchical distribution of clusters between samples upon gating on total live cells. (E, F) Proportion of immune subsets using the supervised gating strategy depicted in Figure S2. Mean +/- SEM is shown, each dot represents a sample. Kruskal-Wallis tests were used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, ns: non-significant.

Figure 2. Diverse phenotypes of CD4⁺ Tconv cells in AITL. (A) Proportion of CD3⁺CD4⁺Foxp3⁻ Tconv cells that comprise transformed and normal cells, among live cells, identified upon manual gating. (B-D) Unsupervised clustering analyses in live Tconv cells. (B) UMAP visualization, FlowSOM distribution of clusters and projection of selected markers in concatenated samples (C) Heatmap showing hierarchical clustering and expression of indicated markers in FlowSOM clusters, and their differential enrichment between groups. (D) Distribution of cells from each group on UMAP. (E) Heatmap showing unsupervised hierarchical separation of clusters between samples. (D) Proportion of PD-1 and ICOS-expressing Tconv cells upon manual gating. Mean +/- SEM is shown. Mann-Whitney tests were used; ns: non-significant.

Figure 3. PTCL-associated CD8⁺ T cells adopt a highly activated, exhausted-like phenotype. (A) UMAP visualization, FlowSOM distribution of clusters and projection of selected markers in concatenated samples, among live CD8⁺ T cells. (B) Heatmap showing hierarchical clustering and expression of indicated markers in FlowSOM clusters, and their differential enrichment between groups. (C) Distribution of cells from each group on UMAP. Proportion of naïve (D) and exhausted (E) CD8⁺ T cells, and Boolean analysis of inhibitory checkpoint-expressing cells (F) upon manual gating. Mean +/- SEM is shown; each dot represents a sample. One-way (D, E) and two-way (F) ANOVA tests were used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, ns: non-significant.

Figure 4. Differential expression pattern of checkpoint receptors on immune subsets in PTCL.

Proportion of checkpoint-expressing cells in different cell subsets following manual gating is shown as mean +/-SEM. Two-way ANOVA tests were used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. Non-significant values are not displayed.

Figure 5. CD39 expression and prognostic value in PTCL. (A) UMAP visualization of CD39

expression across samples. (B) Proportion of CD39⁺ cells across subsets and samples following manual gating. (C) Representative multi-IF staining in a CD39^{high} (top) and a CD39^{low} (bottom) sample. (D) Multi-IF quantification of CD39⁺ cells across subsets and samples. (E) Kaplan-Meier curves of PFS in different cell populations. CD39 high and low populations were split based on median expression across samples. (F) Kaplan-Meier curves of PFS and OS. CD39^{high} and ^{low} samples were split upon ROC curve analyses (G) Hazard Ratio (HR, dots) and 95% confidence interval values (CI, bars) of the different parameters used in multivariate analyses. Two-way ANOVA (B, D), log-rank (E, F) and multivariate Cox regression (G) tests were used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$

Figure S1. Perturbations in immune cell subsets in PTCL tissues. (A) Kaplan-Meier curves of OS

and PFS in the 18-patient flow cytometry cohort. (B) Volcano plots showing significantly up- or down-regulated clusters (yellow circles) presented in Figure 1B. (C) Proportion of proliferating Ki67⁺ cells across cell populations, following manual gating. In C, Kruskal-Wallis tests were used * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, ns: non-significant.

Figure S2. Manual gating strategy used for supervised analyses. An example of gating strategy in an AITL sample is shown.

Figure S3. Perturbations of Tconv cell phenotype in AITL patients. (A) Dot plots showing

heterogeneous expression of checkpoint molecules in selected patients, following manual gating on live Tconv cells. (B) Volcano plots showing differential representation of clusters defined in Figure 2C. Yellow circles denote statistically up or down-regulated clusters.

Figure S4 Analysis of Treg cells. (A) Proportion of Foxp3⁺ Treg cells among live cells (left) and

among CD4⁺ T cells (right) following manual gating. (B-C) UMAP visualization, FlowSOM distribution of clusters (B) and projection of selected markers (C) in concatenated samples. (D) Heatmap showing hierarchical clustering and expression of indicated markers in FlowSOM clusters, and their differential

enrichment between groups. (D) Volcano plots showing differential representation of Treg cell clusters. Yellow circles denote statistically up or down-regulated clusters. (E) Proportion of CD45RA⁺TCF1⁺ naïve Treg cells among total Treg cells. In A, E, mean +/- SEM is shown; each dot represents a sample. Kruskal-Wallis tests were used. * p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001, ns: non-significant.

Figure S5. Analysis of NK cells. (A) Heatmap showing hierarchical clustering and expression of indicated markers in FlowSOM clusters upon gating on live CD7⁺CD56⁺ NK cells. No statistical difference in cluster representation between samples was found. (B-D) Proportions of CD56^{bright} (B), CD56^{dim} (C) and GzmB⁺ NK cells upon manual gating. Kruskal-Wallis tests were used. ns: non-significant.

Figure S6. Analysis of CD8⁺ T cells. (A) Volcano plots showing differential representation of CD8⁺ T-cell clusters. Yellow circles denote statistically up or down-regulated clusters. (B) Heatmap showing unsupervised hierarchical distribution of clusters between samples following gating on live CD8⁺ T cells.

Figure S7. CD39 expression and prognosis value in PTCL. (A) Proportion of CD39⁺ cells among naïve (CD45RA⁺), activated (CD45RA⁻PD-1⁻TIM3⁻) and exhausted (PD-1⁺TIM3⁺) CD8⁺ T cells. (B) Kaplan-Meier curves of OS in patients from the TENOMIC AITL cohort (n=85). *ENTPD1* (CD39) mRNA expression was split in quartiles. (C) Kaplan-Meier curves of PFS and OS in the overall cohort used for multi-IF analyses. (D) Kaplan-Meier curves of PFS and OS in CD3⁺CD8⁺ (top) and CD3⁺CD8⁻ (bottom) populations. CD39 high and low samples were split following ROC curve analyses.

References

1. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC, *et al.* The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* 2022 Sep 15; **140**(11): 1229-1253.
2. Fujisawa M, Chiba S, Sakata-Yanagimoto M. Recent Progress in the Understanding of Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 2017; **57**(3): 109-119.
3. de Leval L, Parrens M, Le Bras F, Jais JP, Fataccioli V, Martin A, *et al.* Angioimmunoblastic T-cell lymphoma is the most common T-cell lymphoma in two distinct French information data sets. *Haematologica* 2015 Sep; **100**(9): e361-364.
4. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013 Jul 25; **39**(1): 1-10.
5. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer* 2012 Mar 15; **12**(4): 298-306.
6. Philip M, Schietinger A. CD8(+) T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nat Rev Immunol* 2022 Apr; **22**(4): 209-223.
7. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* 2015 Apr 9; **161**(2): 205-214.
8. Armand P, Shipp MA, Ribrag V, Michot JM, Zinzani PL, Kuruvilla J, *et al.* Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure. *J Clin Oncol* 2016 Nov 1; **34**(31): 3733-3739.
9. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, *et al.* PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine* 2015 Jan 22; **372**(4): 311-319.
10. Bennani NN, Kim HJ, Pederson LD, Atherton PJ, Micallef IN, Thanarajasingam G, *et al.* Nivolumab in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: modest activity and cases of hyperprogression. *Journal for immunotherapy of cancer* 2022 Jun; **10**(6).
11. Shi Y, Wu J, Wang Z, Zhang L, Wang Z, Zhang M, *et al.* Efficacy and safety of geptanolimab (GB226) for relapsed or refractory peripheral T cell lymphoma: an open-label phase 2 study (Gxplora-002). *Journal of hematology & oncology* 2021 Jan 12; **14**(1): 12.
12. Ratner L, Waldmann TA, Janakiram M, Brammer JE. Rapid Progression of Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma after PD-1 Inhibitor Therapy. *The New England journal of medicine* 2018 May 17; **378**(20): 1947-1948.
13. Wartewig T, Kurgys Z, Keppler S, Pechloff K, Hameister E, Ollinger R, *et al.* PD-1 is a haploinsufficient suppressor of T cell lymphomagenesis. *Nature* 2017 Dec 7; **552**(7683): 121-125.
14. Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, *et al.* PD-1(+) regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2019 May 14; **116**(20): 9999-10008.

15. Wilcox RA, Wada DA, Ziesmer SC, ElSawa SF, Comfere NI, Dietz AB, *et al.* Monocytes promote tumor cell survival in T-cell lymphoproliferative disorders and are impaired in their ability to differentiate into mature dendritic cells. *Blood* 2009 Oct 1; **114**(14): 2936-2944.
16. Ham JS, Park HY, Ryu KJ, Ko YH, Kim WS, Kim SJ. Elevated serum interleukin-10 level and M2 macrophage infiltration are associated with poor survival in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Oncotarget* 2017 Sep 29; **8**(44): 76231-76240.
17. Sugio T, Miyawaki K, Kato K, Sasaki K, Yamada K, Iqbal J, *et al.* Microenvironmental immune cell signatures dictate clinical outcomes for PTCL-NOS. *Blood Adv* 2018 Sep 11; **2**(17): 2242-2252.
18. Zhu Q, Deng X, Yao W, Chen Z, Ye Y, Gao L, *et al.* Novel tumour-infiltrating lymphocyte-related risk stratification based by flow cytometry for patients with de novo angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Ann Hematol* 2021 Mar; **100**(3): 715-723.
19. Chen Z, Zhu Q, Deng X, Yao W, Zhang W, Liu W, *et al.* Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with predominant CD8+ tumor-infiltrating T-cells is a distinct immune pattern with an immunosuppressive microenvironment. *Front Immunol* 2022; **13**: 987227.
20. Lundberg J, Berglund D, Molin D, Kinch A. Intratumoral expression of FoxP3-positive regulatory T-cells in T-cell lymphoma: no correlation with survival. *Ups J Med Sci* 2019 Apr; **124**(2): 105-110.
21. Bruneau J, Canioni D, Renand A, Marafioti T, Paterson JC, Martin-Garcia N, *et al.* Regulatory T-cell depletion in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *The American journal of pathology* 2010 Aug; **177**(2): 570-574.
22. Pritchett JC, Yang ZZ, Kim HJ, Villasboas JC, Tang X, Jalali S, *et al.* High-dimensional and single-cell transcriptome analysis of the tumor microenvironment in angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL). *Leukemia* 2022 Jan; **36**(1): 165-176.
23. Taube JM, Roman K, Engle EL, Wang C, Ballesteros-Merino C, Jensen SM, *et al.* Multi-institutional TSA-amplified Multiplexed Immunofluorescence Reproducibility Evaluation (MITRE) Study. *Journal for immunotherapy of cancer* 2021 Jul; **9**(7).
24. Gaulard P, de Leval L. Follicular helper T cells: implications in neoplastic hematopathology. *Semin Diagn Pathol* 2011 Aug; **28**(3): 202-213.
25. Judge SJ, Dunai C, Aguilar EG, Vick SC, Sturgill IR, Khuat LT, *et al.* Minimal PD-1 expression in mouse and human NK cells under diverse conditions. *The Journal of clinical investigation* 2020 Jun 1; **130**(6): 3051-3068.
26. Moesta AK, Li XY, Smyth MJ. Targeting CD39 in cancer. *Nat Rev Immunol* 2020 Dec; **20**(12): 739-755.
27. Fujisawa M, Nguyen TB, Abe Y, Suehara Y, Fukumoto K, Suma S, *et al.* Clonal germinal center B cells function as a niche for T-cell lymphoma. *Blood* 2022 Nov 3; **140**(18): 1937-1950.
28. Delfau-Larue MH, de Leval L, Joly B, Plonquet A, Challine D, Parrens M, *et al.* Targeting intratumoral B cells with rituximab in addition to CHOP in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. A clinicobiological study of the GELA. *Haematologica* 2012 Oct; **97**(10): 1594-1602.

29. Querfeld C, Leung S, Myskowski PL, Curran SA, Goldman DA, Heller G, *et al.* Primary T Cells from Cutaneous T-cell Lymphoma Skin Explants Display an Exhausted Immune Checkpoint Profile. *Cancer immunology research* 2018 Aug; **6**(8): 900-909.
30. Heming M, Haessner S, Wolbert J, Lu IN, Li X, Brokinkel B, *et al.* Intratumor heterogeneity and T cell exhaustion in primary CNS lymphoma. *Genome Med* 2022 Sep 24; **14**(1): 109.
31. Yang ZZ, Liang AB, Ansell SM. T-cell-mediated antitumor immunity in B-cell non-Hodgkin lymphoma: activation, suppression and exhaustion. *Leuk Lymphoma* 2015; **56**(9): 2498-2504.
32. Ansell SM, Lin Y. Immunotherapy of lymphomas. *The Journal of clinical investigation* 2020 Apr 1; **130**(4): 1576-1585.
33. Li X, Liu Z, Mi M, Zhang C, Xiao Y, Liu X, *et al.* Identification of hub genes and key pathways associated with angioimmunoblastic T-cell lymphoma using weighted gene co-expression network analysis. *Cancer Manag Res* 2019; **11**: 5209-5220.
34. Yu J, Song Y, Tian W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *Journal of hematology & oncology* 2020 May 5; **13**(1): 45.
35. Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Vence L, Wargo J, Allison JP, *et al.* Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3(+) Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers-Response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019 Jun 1; **25**(11): 3469-3470.
36. Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C, Ballabeni P, *et al.* Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015 May 12; **112**(19): 6140-6145.
37. Quezada SA, Peggs KS. Lost in Translation: Deciphering the Mechanism of Action of Anti-human CTLA-4. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019 Feb 15; **25**(4): 1130-1132.
38. Ha D, Tanaka A, Kibayashi T, Tanemura A, Sugiyama D, Wing JB, *et al.* Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2019 Jan 8; **116**(2): 609-618.
39. Semmrich M, Marchand JB, Fend L, Rehn M, Remy C, Holmkvist P, *et al.* Vectorized Treg-depleting alphaCTLA-4 elicits antigen cross-presentation and CD8(+) T cell immunity to reject 'cold' tumors. *Journal for immunotherapy of cancer* 2022 Jan; **10**(1).
40. Nicholson SM, Carlesso G, Cheng LI, Cook H, DaCosta K, Leininger J, *et al.* Effects of ICOS+ T cell depletion via afucosylated monoclonal antibody MEDI-570 on pregnant cynomolgus monkeys and the developing offspring. *Reprod Toxicol* 2017 Dec; **74**: 116-133.
41. Julio C. Chavez M, Francine M. Foss, MD, Basem M. William, MD, MDMRCP, Jonathan E Brammer, MD, Sonali M. Smith, MD, Anca Prica, MD, Jasmine M. Zain, MD, Joseph M Tuscano, MD, Martha Glenn, MD, Neha Mehta-Shah, MD, Ben X Wang, Stephanie Zantinge, Lisa Wang, Ling Zhang, MD, Anmarie Boutrin, Weiguang Zhao, Lily Cheng, Nathan Standifer, Gianluca Carlesso, Jeffrey Moscow, Lillian Siu, MD. A Phase I Study of Anti-ICOS Antibody MEDI-570 for Relapsed/Refractory (R/R) Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL) and Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma (AITL) (NCI-9930). *Blood* 2020; **136**(supplement 1): 5-6.

42. van Hall T, Andre P, Horowitz A, Ruan DF, Borst L, Zerbib R, *et al.* Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. *Journal for immunotherapy of cancer* 2019 Oct 17; **7**(1): 263.
43. Perrot I, Michaud HA, Giraudon-Paoli M, Augier S, Docquier A, Gros L, *et al.* Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. *Cell reports* 2019 May 21; **27**(8): 2411-2425 e2419.
44. Nagate Y, Ezoë S, Fujita J, Okuzaki D, Motooka D, Ishibashi T, *et al.* Ectonucleotidase CD39 is highly expressed on ATLL cells and is responsible for their immunosuppressive function. *Leukemia* 2021 Jan; **35**(1): 107-118.
45. Bensussan A, Janela B, Thonnart N, Bagot M, Musette P, Ginhoux F, *et al.* Identification of CD39 as a Marker for the Circulating Malignant T-Cell Clone of Sezary Syndrome Patients. *The Journal of investigative dermatology* 2019 Mar; **139**(3): 725-728.
46. Nakamura K, Casey M, Oey H, Vari F, Stagg J, Gandhi MK, *et al.* Targeting an adenosine-mediated "don't eat me signal" augments anti-lymphoma immunity by anti-CD20 monoclonal antibody. *Leukemia* 2020 Oct; **34**(10): 2708-2721.
47. Yang R, Elsaadi S, Misund K, Abdollahi P, Vandsemb EN, Moen SH, *et al.* Conversion of ATP to adenosine by CD39 and CD73 in multiple myeloma can be successfully targeted together with adenosine receptor A2A blockade. *Journal for immunotherapy of cancer* 2020 May; **8**(1).
48. Perry C, Hazan-Halevy I, Kay S, Cipok M, Grisaru D, Deutsch V, *et al.* Increased CD39 expression on CD4(+) T lymphocytes has clinical and prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 2012 Aug; **91**(8): 1271-1279.
49. Aroua N, Boet E, Ghisi M, Nicolau-Travers ML, Saland E, Gwilliam R, *et al.* Extracellular ATP and CD39 Activate cAMP-Mediated Mitochondrial Stress Response to Promote Cytarabine Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer discovery* 2020 Oct; **10**(10): 1544-1565.
50. Li XY, Moesta AK, Xiao C, Nakamura K, Casey M, Zhang H, *et al.* Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity. *Cancer discovery* 2019 Dec; **9**(12): 1754-1773.
51. Hilchey SP, Kobie JJ, Cochran MR, Secor-Socha S, Wang JC, Hyrien O, *et al.* Human follicular lymphoma CD39+-infiltrating T cells contribute to adenosine-mediated T cell hyporesponsiveness. *Journal of immunology* 2009 Nov 15; **183**(10): 6157-6166.
52. Sonigo G, Bozonnet A, Dumont M, Thonnart N, Ram-Wolff C, de Masson A, *et al.* Involvement of the CD39/CD73/adenosine pathway in T-cell proliferation and NK cell-mediated antibody-dependent cell cytotoxicity in Sezary syndrome. *Blood* 2022 Apr 28; **139**(17): 2712-2716.

Figure 1

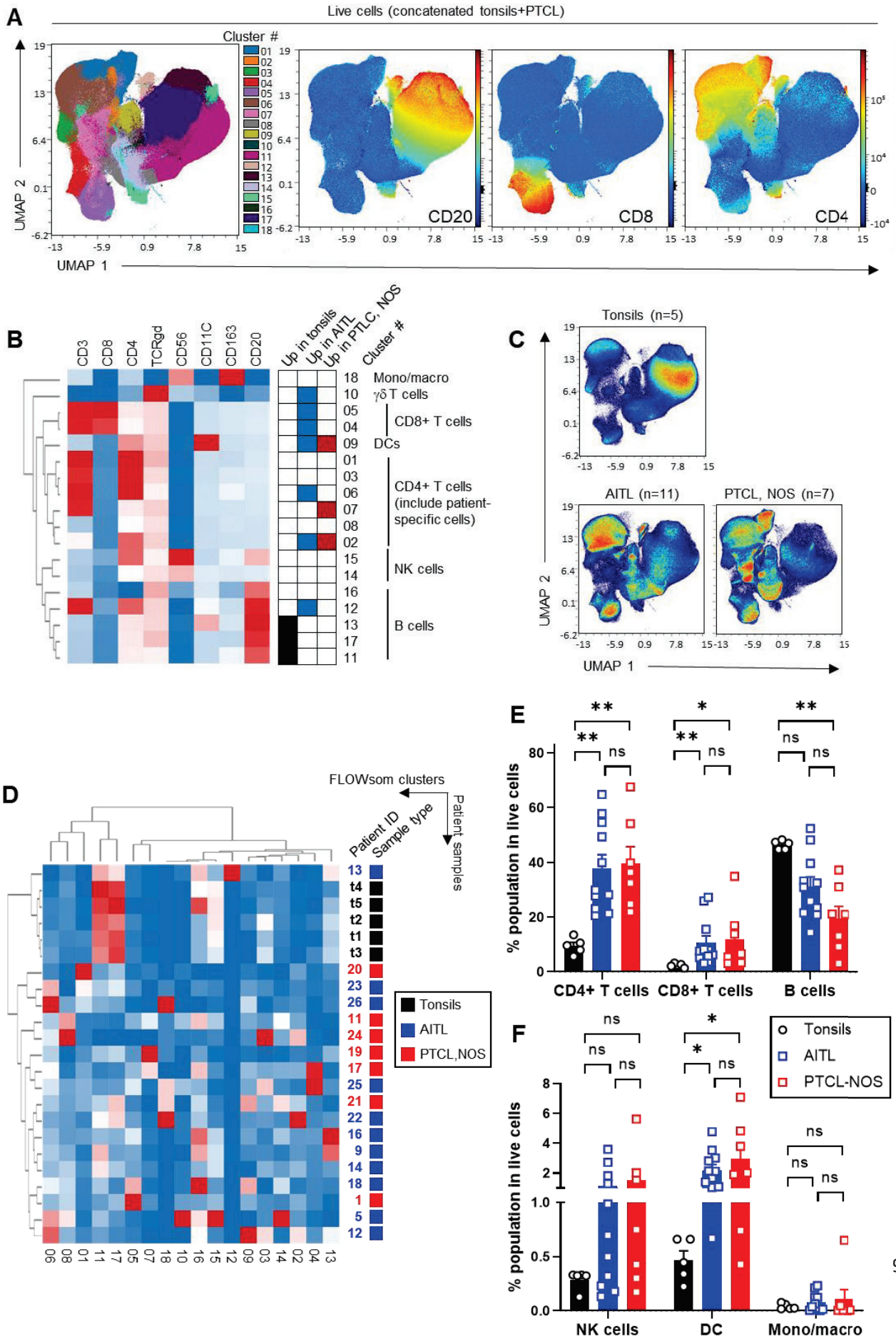


Figure 2

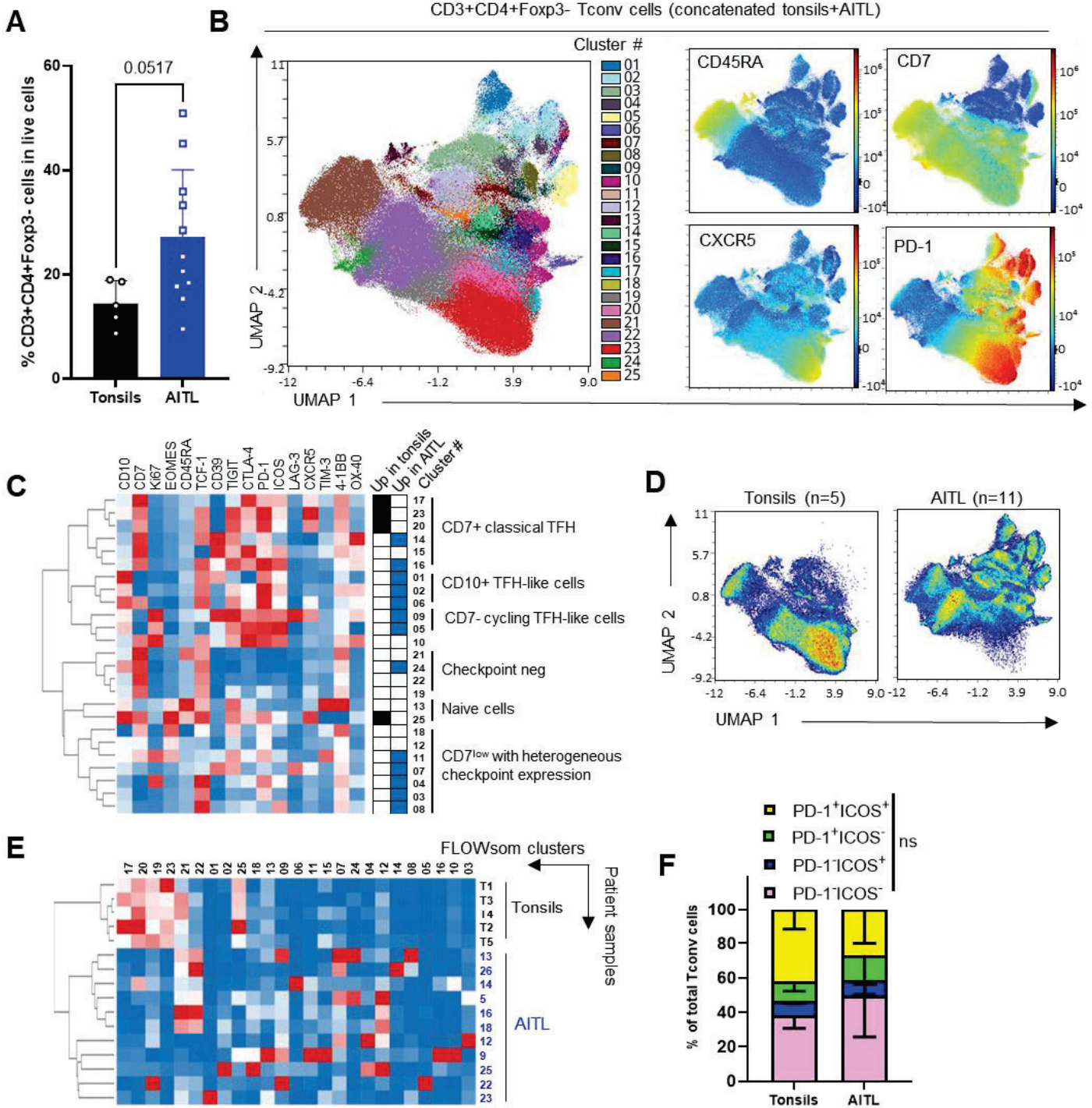


Figure 3

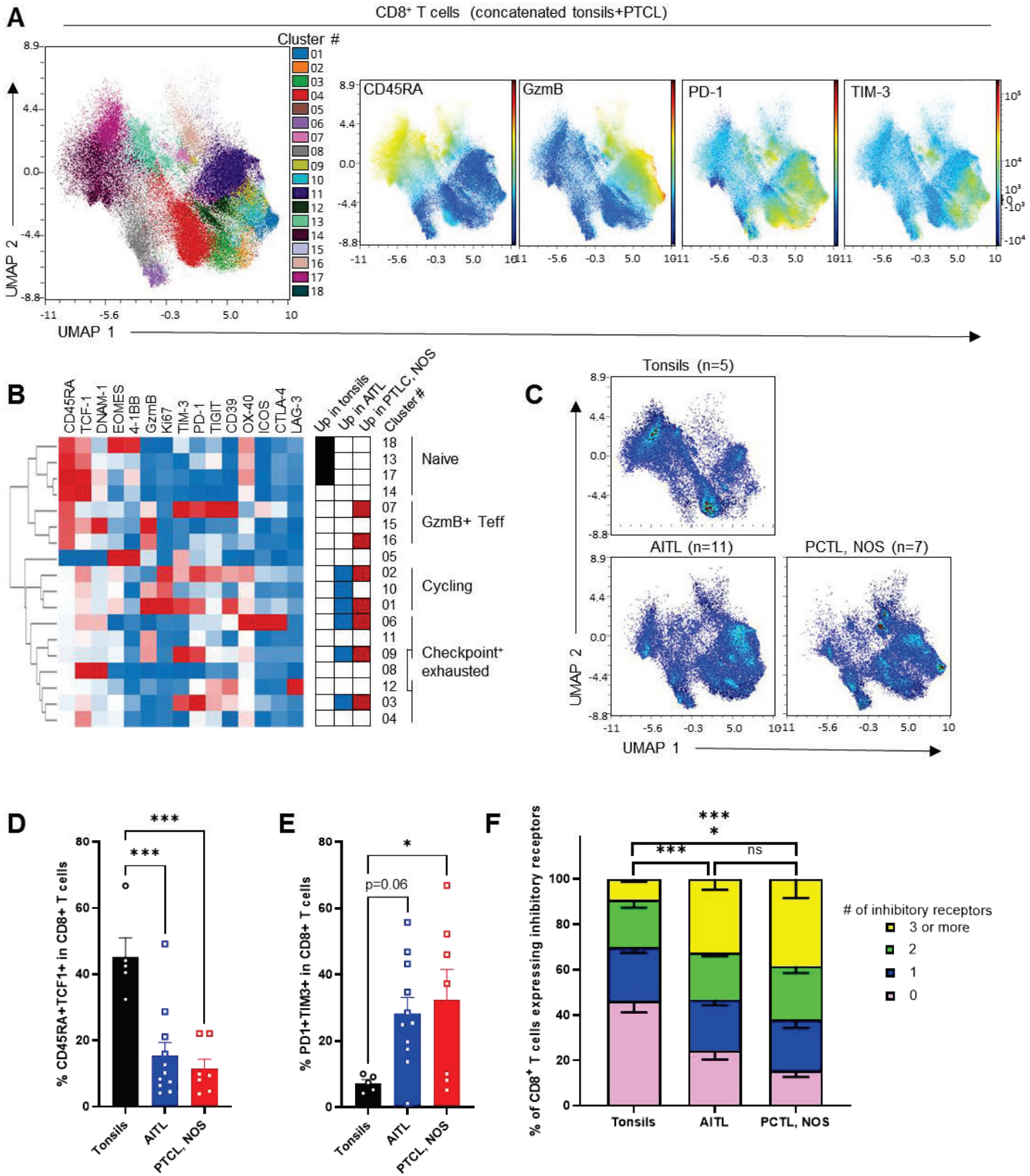


Figure 4

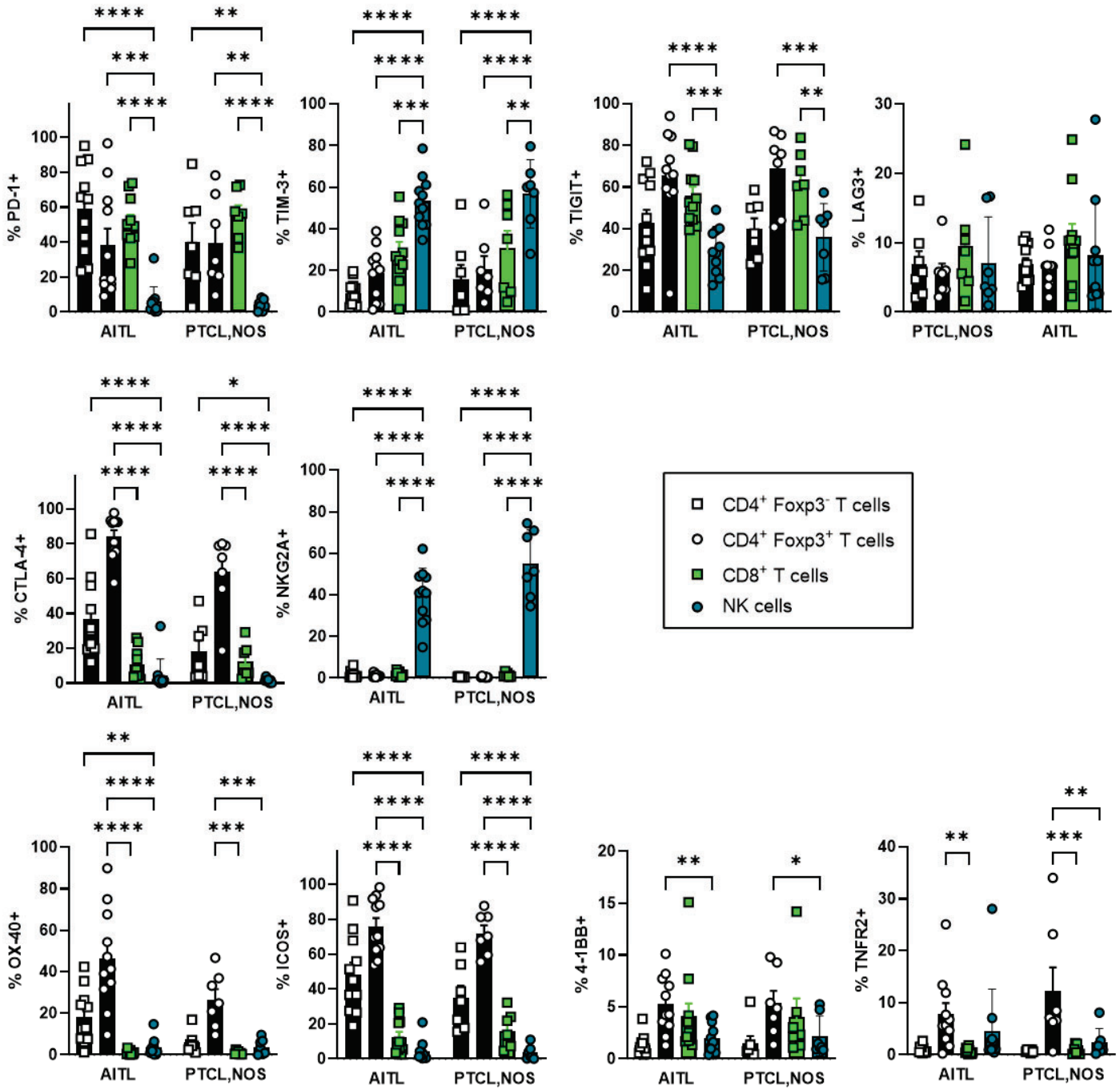


Figure 5

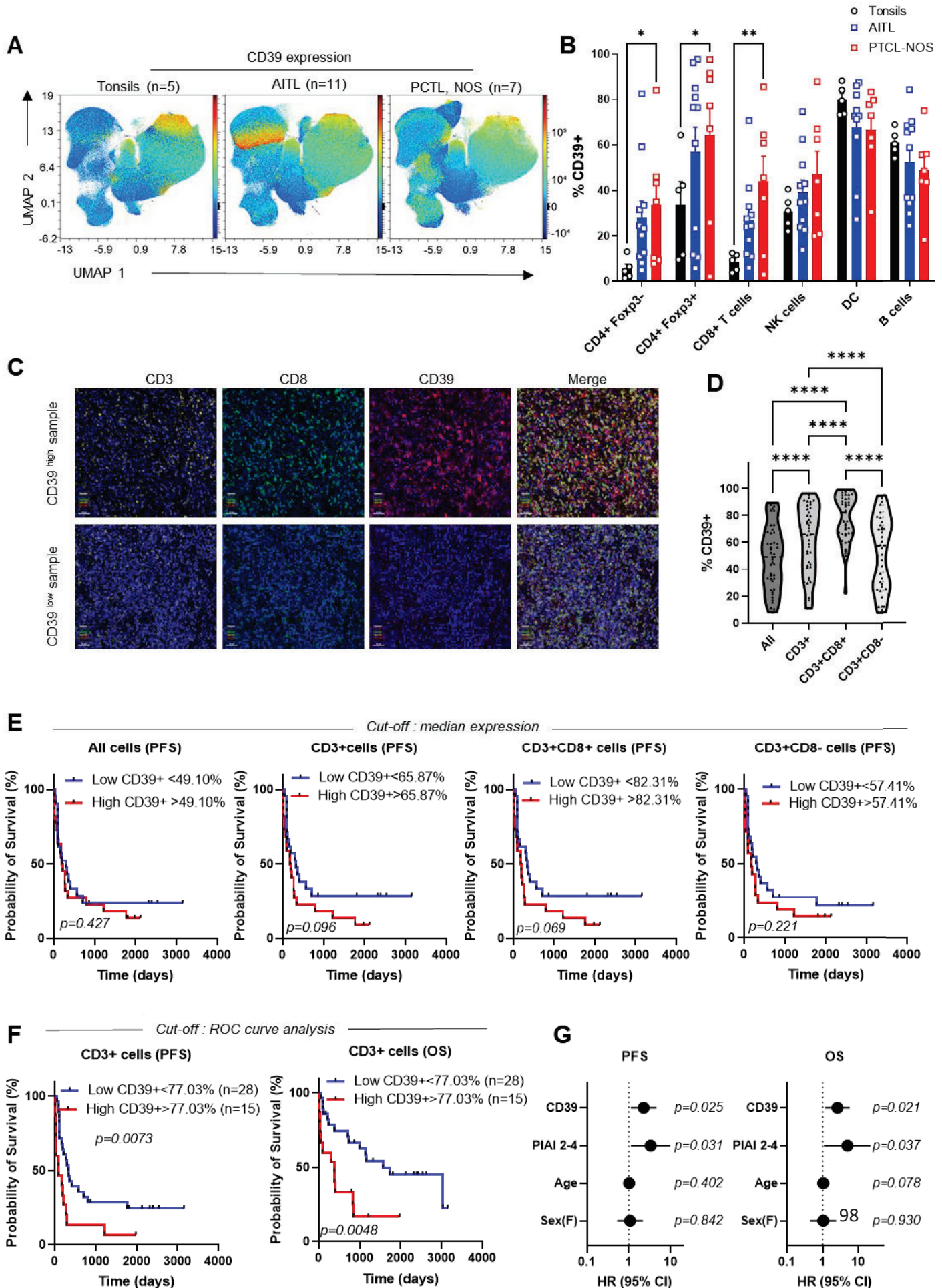


Figure S1

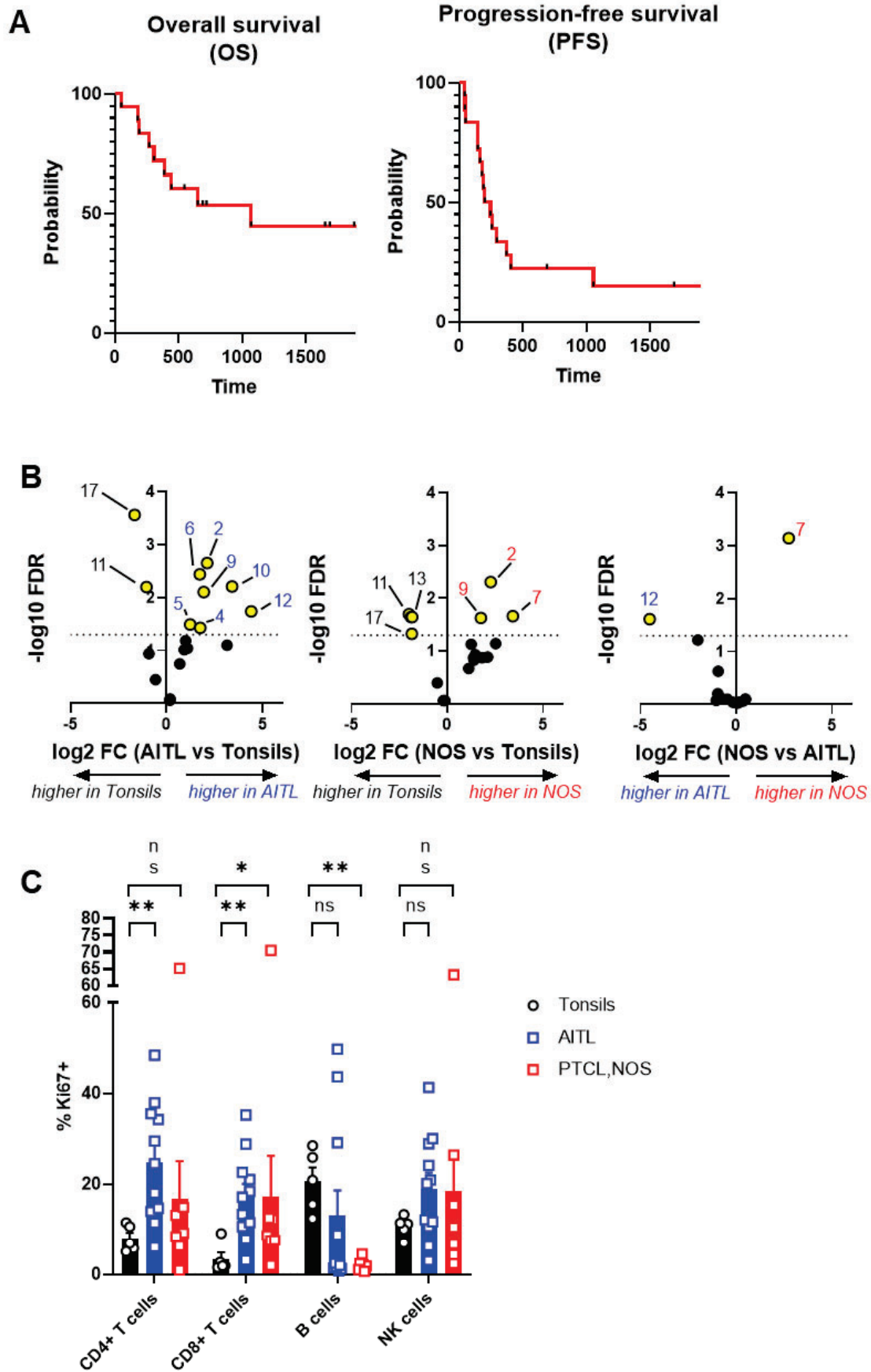


Figure S2

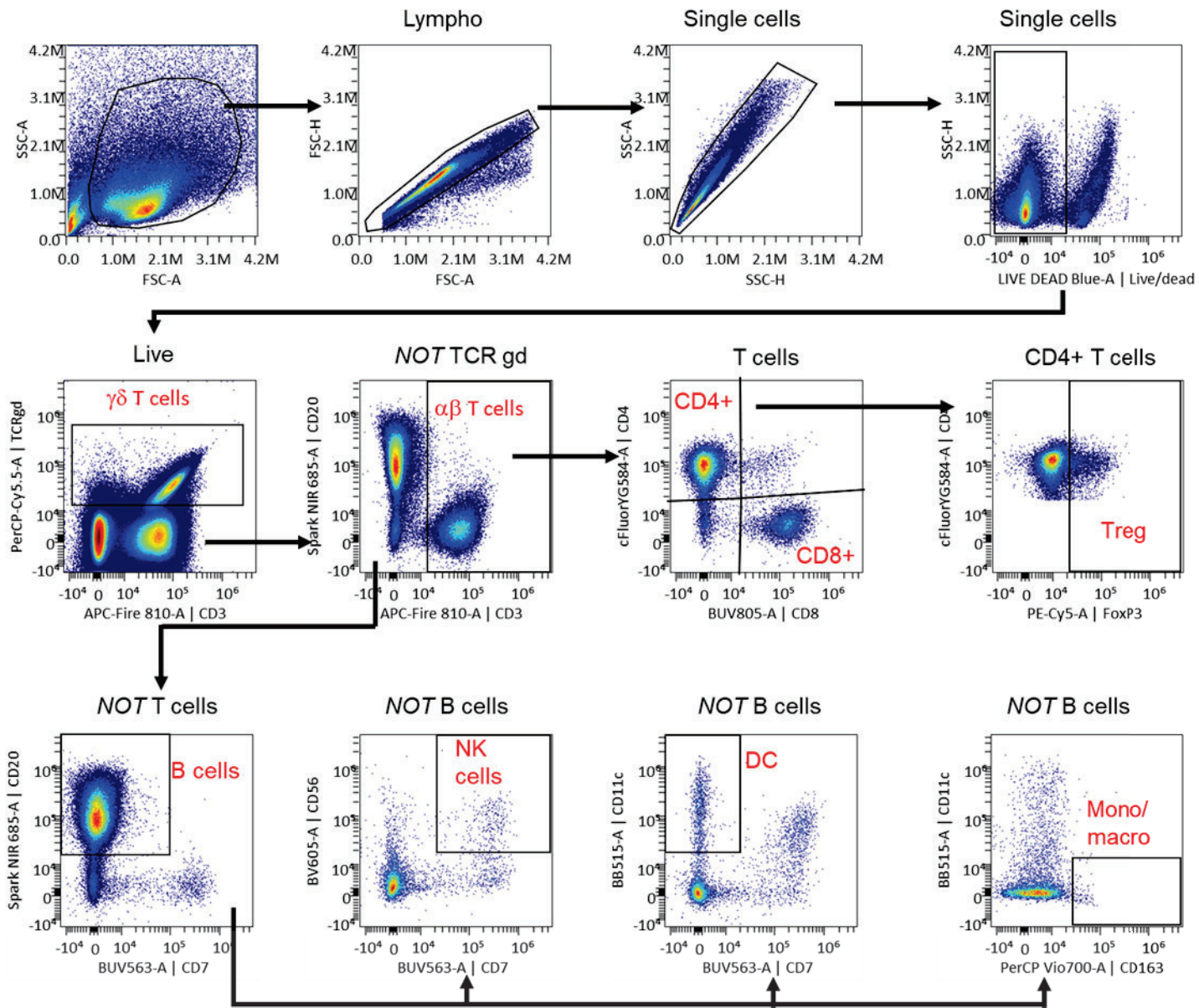


Figure S3

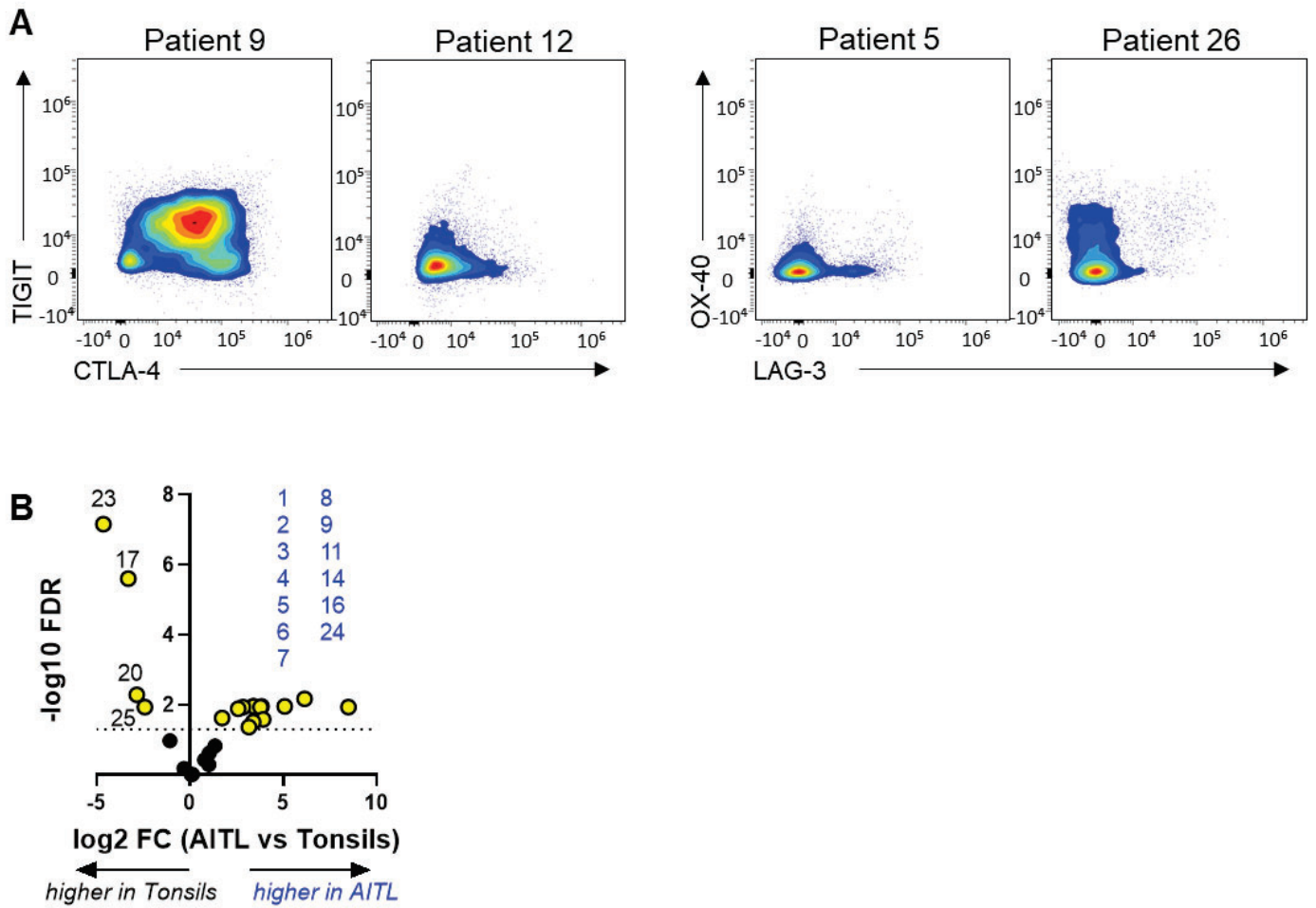


Figure S4

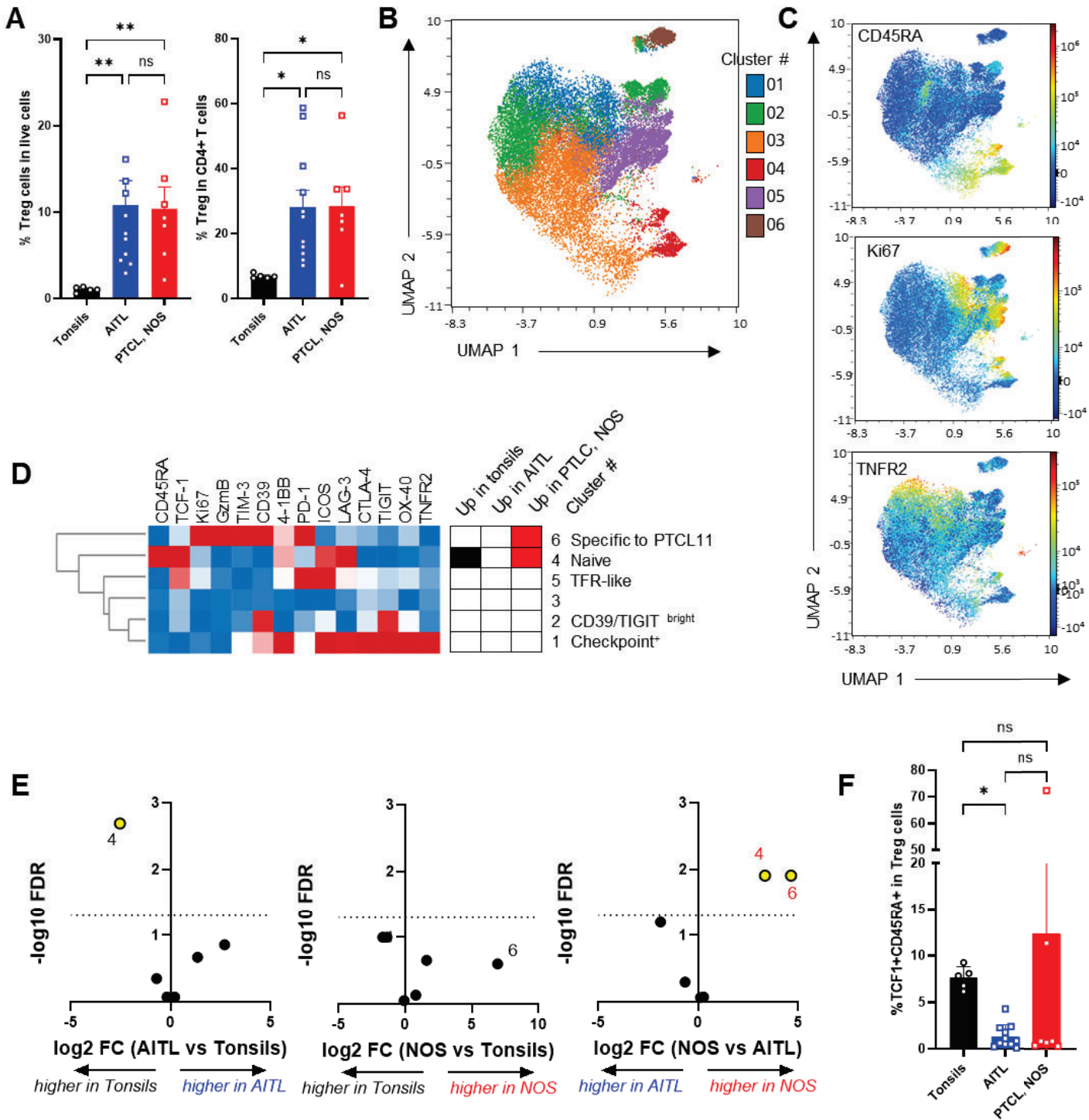


Figure S5

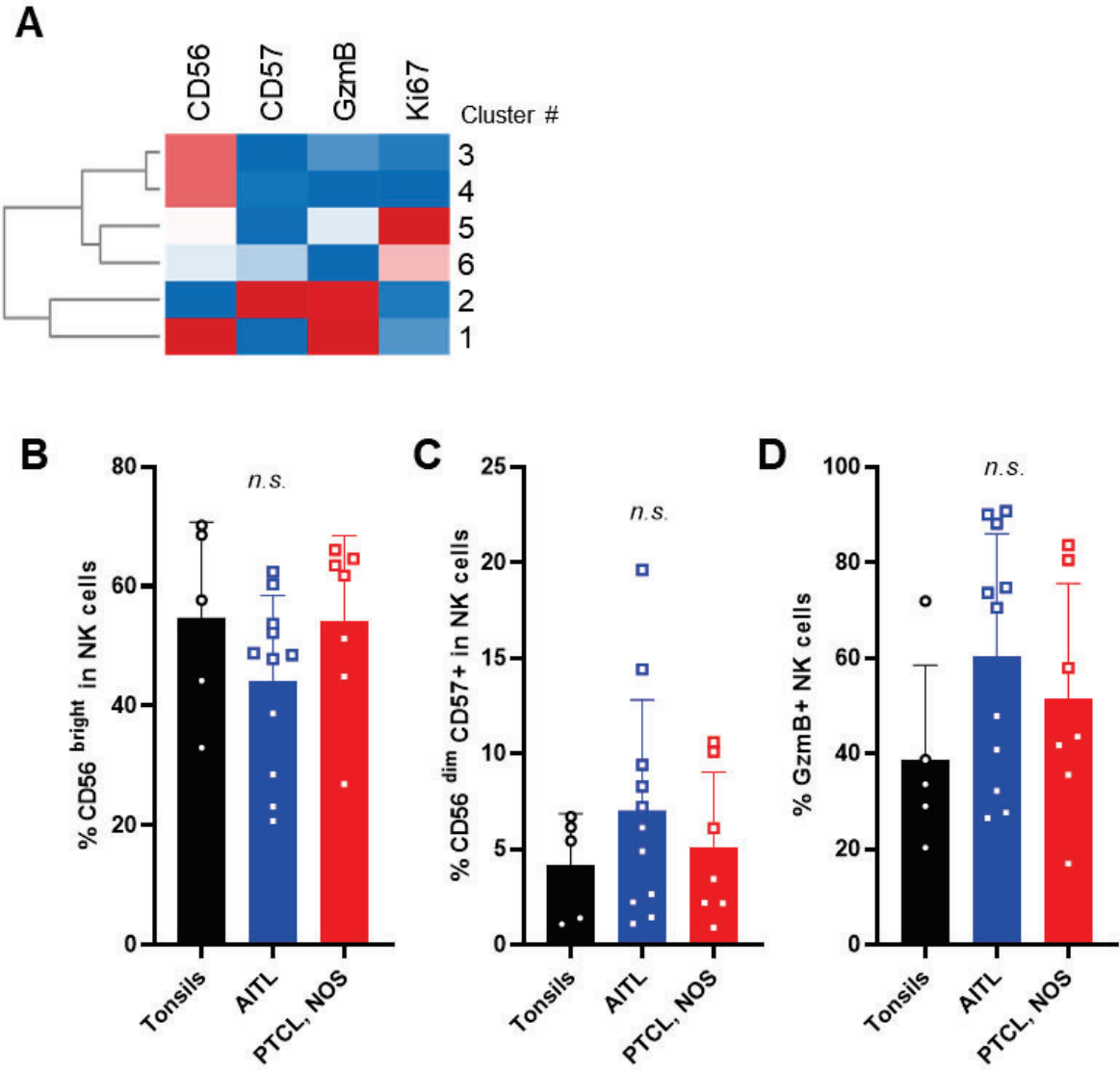


Figure S6

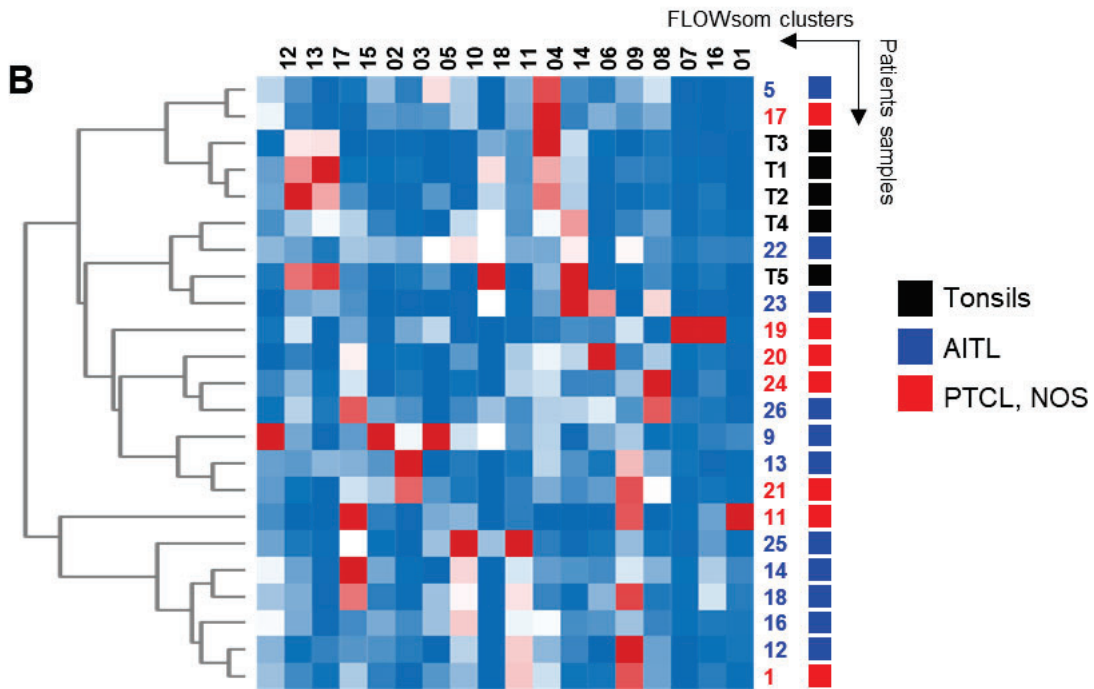
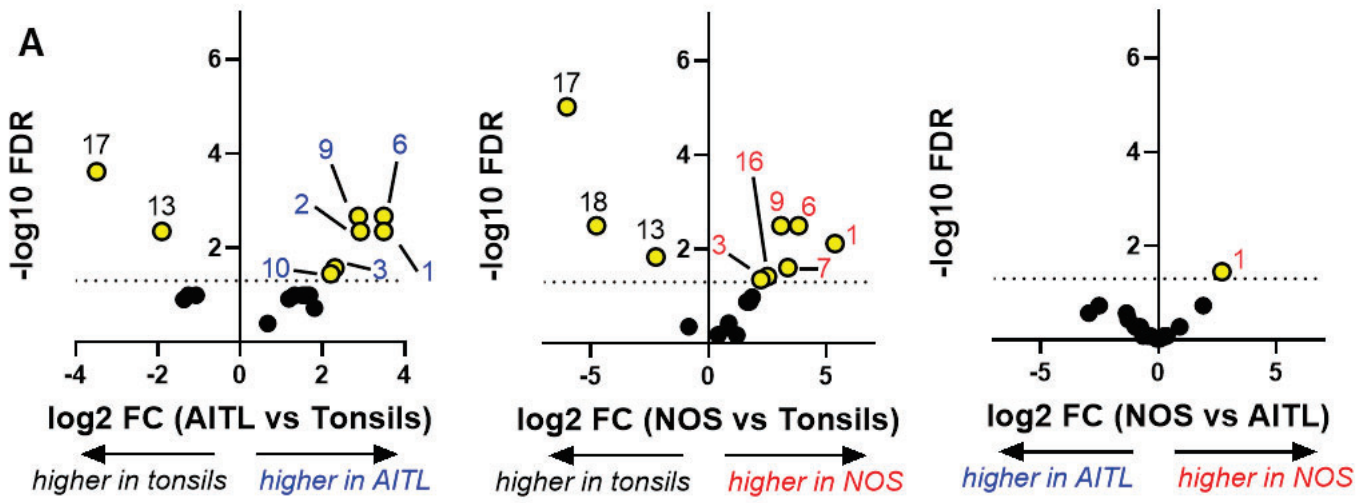
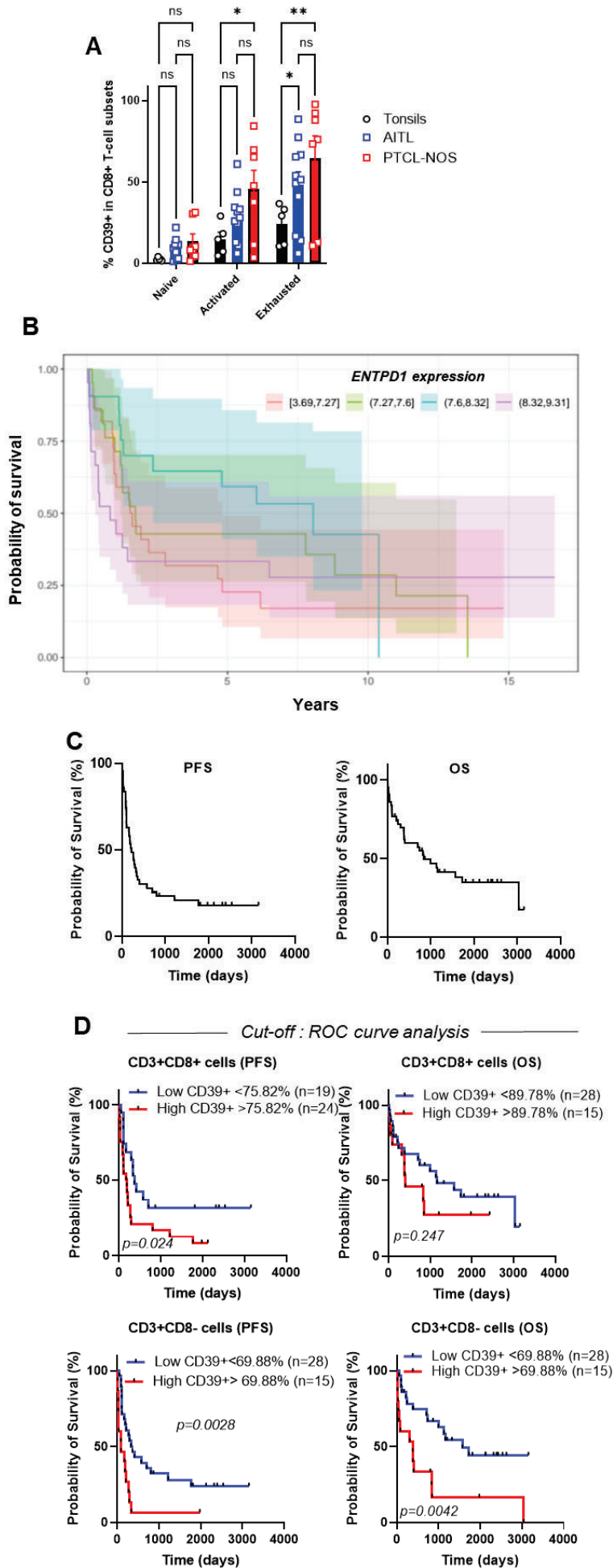


Figure S7



General populations	General phenotype	Activation checkpoints	Inhibitory checkpoints
Live/Dead	CD10	ICOS	PD-1
CD3	CXCR5	OX-40	CTLA-4
CD4	BCL6	4-1BB	TIM-3
CD7	Ki67	TNFR2	LAG-3
CD8	EOMES	DNAM-1	NKG2A
FOXP3	T-BET		CD39
CD56	GZMB		TIGIT
CD57	TCF-1		
CD20	CD45RA		
CD11c			
CD163			
TCR $\gamma\delta$			

Table 1. Spectral flow cytometry panel

	N patients with available data	n	%
Age median [range] Age <60y Age ≥60y Age ≥70y	18 67 [39-82]	6 5 7	33 28 39
Sex Male Female	18	8 10	44 56
Type of PTCL AITL PTCL-NOS	18	11 7	61 39
Ann Arbor stage I II III IV	17	0 0 7 10	0 0 41 59
ECOG performance status 0 1 2 3 4	15	6 3 2 1 3	40 20 13 7 20
B symptoms No Yes	16	4 12	25 75
Extranodal sites 0 1 ≥2	15	6 3 6	40 20 40
Bone marrow involvement No Yes	11	9 2	82 8
LDH ≤ Upper limit of normal > Upper limit of normal	14	3 11	21 79
Hemoglobin ≥ 12g/dL <12g/dL	13	7 6	54 46
IPI 0 1 2 3 4 5 IPI simplifié <3 ≥3	15 17	0 1 0 10 3 1 1 16	0 7 0 67 20 7 6 94

PIT	15		
0		1	7
1		2	13
2		8	53
3		4	27
4		0	0
PIT (simplified)	16		
<2		3	19
≥2		13	81
PIAI (simplified)	16		
<2		0	0
≥2		16	100

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of the PTCL cohort used in spectral flow cytometry analyses

Sample ID	Diagnosis	Clinical phenotyping data
PTCL 1	NOS	Not done
PTCL 5	AITL	CD2+ CD3+ CD7+ CD4+ CD8- CD10- BCL6low PDL1low CXCL13-
PTCL 9	AITL	CD2+ CD3+CD5+ CD4+ CD8- CD7+ PD-1+ ICOS+ CXCL13+ CD10- BCL6- CD30+(15%)
PTCL 11	NOS	CD2+ CD3+ CD5- CD7- CD4- CD8- CD30low ICOS +/- PD-1 +/- EMA- CD10- ALK1- GZMB+ Perforin+ TiA1+
PTCL 12	AITL	CD2+ CD3+ CD5+ CD7+/- CD4+ CD8- TCRb1+ CD10- BCL6- PD1+ ICOS+ CXCL13- CD30- CD25- CD103+ CD56- Perforine- TiA1-
PTCL 13	AITL	CD20+ CD79a- PAX5- CD3+ CD2+ CD5+ CD7- CD4+ CD8- TCRb1+ CD10- ICOS+ PD1+ BCL6+(heterogeneous) CXCL13+ CD30(10%) CD25-
PTCL 14	AITL	CD3+ CD4+/- CD8- CD5+ CD2+ CD7+ PD1+ CXCL13+(partial) ICOS+(heterogeneous) CD15-
PTCL 16	AITL	CD3+ CD4+ CD5+ PD1+ CD7low CD10- CXCL13-
PTCL 17	NOS	CD3+ CD4+ CD8- CD5+ CD7- CD30- CD10- PD-1 +/- CXCL13-
PTCL 18	AITL	CD3+ CD4+ CD8- CD7low PD1+ CXCL13+ CD10+(heterogeneous) BCL6-
PTCL 19	NOS	CD3+ CD4+ CD7+ Ki67+
PTCL 20	NOS	CD3+ CD4+ CD7+ CD10-
PTCL 21	NOS	CD3+ CD5low CD4+ CD8- PD1+(heterogeneous) CXCL13+(heterogeneous) CD30-
PTCL 22	AITL	CD3+ CD4+ CD10+ PD1+ CD7low
PTCL 23	AITL	CD3+ CD4+ CD10+ PD1+ CD7-
PTCL 24	NOS	CD3+ CD4+ CD7- PD1- CD10-
PTCL 25	AITL	CD3+ CD4+ CD7- PD1+ CD10+ Bcl6+
PTCL 26	AITL	CD3+ CD4+ CD7+ PD1+ CD10- Bcl6-

Supplementary Table 2. Individual clinical immunophenotyping data of the spectral flow cytometry cohort

	N patients with available data	n	%
Age median [range] Age <60y Age ≥60y Age ≥70y	43	69 [30-87] 11 11 21	 26 26 49
Sex Male Female	43	24 19	56 44
Type of PTCL AITL PTCL-NOS	43	43 0	100 0
Ann Arbor stage I II III IV	42	0 2 19 21	0 5 45 50
ECOG performance status 0 1 2 3 4	41	4 13 17 4 3	10 32 41 29 7
B symptoms No Yes	43	9 34	21 79
Extranodal sites 0 1 ≥2	42	20 12 10	48 28 24
Bone marrow involvement No Yes	33	16 17	49 51
LDH ≤ Upper limit of normal > Upper limit of normal	41	5 36	12 88
Hemoglobin ≥ 12g/dL <12g/dL	40	17 23	42 58
Platelets ≥ 150 000/mm ³ <150 000/mm ³	39	34 5	87 13
Monocytes ≥800/mm ³ <800/mm ³	34	14 20	41 59
IPI 0 1 2	41	0 1 6	0 2 15

3		13	32
4		18	44
5		3	7
IPI simplifié	41		
<3		7	17
≥3		34	83
PIT	32		
0		0	0
1		4	13
2		10	33
3		13	38
4		5	15
PIT (simplified)	41		
<2		4	10
≥2		37	90
PIAI	39		
0		2	7
1		6	16
2		10	27
3		14	33
4		7	18
5		0	0
PIAI (simplified)	43		
<2		8	19
≥2		35	81

Supplementary Table 3. Clinical characteristics of the PTCL cohort used in multi-IF analyses

Reagent	Source	Identifier	Working concentration
Live/Dead Blue	Thermo Fisher Scientific	L23105	1/1000
BV711 Rat Anti-Human CXCR5 (CD185) (RF8B2)	BD Biosciences	740737	1/80
cFluor® YG584 Anti-Human CD4 (SK3)	Cytex	SKU R7-20041	1/100
Spark NIR™ 685 anti-human CD20 Antibody (2H7)	BioLegend	302366	1/40
APC/Fire™ 750 anti-human CD39 Antibody (A1)	BioLegend	328230	1/80
Pacific Blue™ anti-human CD57 Antibody (HNK-1)	BioLegend	359608	1/80
APC/Fire™ 810 anti-human CD3 Antibody (SK7)	BioLegend	344858	1/80
Vio® Bright FITC anti-human CD120b (TNF-RII) Antibody, REAfinity™ (REA520)	Miltenyi Biotec	130-119-777	1/50
PE/Dazzle™ 594 anti-human TIGIT (VSTM3) Antibody (A15153G)	BioLegend	372716	1/40
PE/Cy5.5 LAG-3 Antibody (17B4)	Novus Biologicals	NBP1-97657PECY55	1/3200
PerCP-Vio® 700 anti-human CD163 Antibody, REAfinity™ (REA812)	Miltenyi Biotec	130-112-133	1/100
PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human TCR γδ (B1)	BD Biosciences	564157	1/20
CD137 Antibody, anti-human, APC, REAfinity™ (REA765)	Miltenyi Biotec	130-110-764	1/50
BUV563 Mouse Anti-Human CD7 (M-T701)	BD Biosciences	741355	1/80
Brilliant Violet 570™ anti-human CD45RA Antibody (HI100)	BioLegend	304132	1/40
BV605 Mouse Anti-Human CD56 (NCAM16.2)	BD Biosciences	562780	1/40
BUV805 Mouse Anti-Human CD8 (SK1)	BD Biosciences	612889	1/80
BB515 Mouse Anti-Human CD11c (B-ly6)	BD Biosciences	564490	1/40
BV510 Mouse Anti-Human NKG2A (CD159a) (131411)	BD Biosciences	747922	1/20
BUV661 Mouse Anti-Human CD226 (DX11)	BD Biosciences	749934	1/40
BUV737 Mouse Anti-Human CD134 (ACT35)	BD Biosciences	749286	1/40
BV750 Mouse Anti-Human CD278 (ICOS) (DX29)	BD Biosciences	746858	1/40
BUV615 Mouse Anti-Human TIM-3 (CD366) (7D3)	BD Biosciences	752363	1/20
BV786 Mouse Anti-Human CD279 (PD-1) (EH12.1)	BD Biosciences	563789	1/40
BUV496 Mouse Anti-Human CD10 (MEM-78)	BD Biosciences	750190	1/40
Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-TCF-7/TCF-1 (S33-966)	BD Biosciences	566693	1/20
PE-Cyanine5 anti-human FOXP3 Monoclonal Antibody (PCH101)	Thermo Fisher Scientific	15-4776-42	1/40
Alexa Fluor® 700 Mouse anti-Human Granzyme B (GB11)	BD Biosciences	560213	1/80
PE-Cyanine7 anti-human CD152 (CTLA-4) (14D3)	Thermo Fisher Scientific	25-1529-42	1/40
PE Mouse Anti-EOMES (X4-83)	BD Biosciences	566749	1/20
BV650 Mouse Anti-T-bet (O4-46)	BD Biosciences	564142	1/40
BUV395 Mouse Anti-Ki-67 (B56)	BD Biosciences	564071	1/40
BV421 Mouse Anti-Bcl-6 (K112-91)	BD Biosciences	563363	1/40

Reagent	Source	Identifier	Working concentration
Mouse anti-human CD3 (polyclonal)	Agilent	A052	1/100
Mouse anti-human CD8 (C8/144B)	Agilent	M7103	1/40
Rabbit anti-human CD39 (polyclonal)	Sigma Aldrich	HPA014067	1/50

Supplementary Table 4. FACS and multi-IF Abs used in this study

Projet Annexe : Etude du phénotype immunitaire chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B développant une résistance à l'Ibrutinib (manuscrit en préparation)

Etude du phénotype immunitaire chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B développant une résistance à l'Ibrutinib

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC), leucémie la plus courante, consiste en l'accumulation clonale de lymphocytes B matures dans les organes lymphoïdes secondaires, la moëlle osseuse et le sang (519). Dans la majorité des cas (80%) le diagnostic de LLC est fortuit devant une hyperlymphocytose sanguine et repose sur l'immunophénotypage sanguin. Un tiers des patients ne sera jamais traité.

Les anomalies moléculaires sont des marqueurs pronostiques importants. Le statut IGHV non muté en comparaison au statut muté et les mutations de type del(11q), del(17p) et/ou TP53 sont de pronostic péjoratif (520).

Au cours des dernières années le développement accéléré des thérapies innovantes a largement modifié la prise en charge de la LLC. Ainsi la French Innovate Leukemia Organization (FILO) recommande dès la 1^{ère} ligne l'utilisation d'un inhibiteur de BCL2 (Venetoclax) ou un inhibiteur de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK) tel que l'Ibrutinib, en fonction du profil mutationnel d'IGHV et des anomalies de TP53 (521).

A l'inverse des PTCL, le microenvironnement immunitaire de la LLC est relativement bien décrit. L'un des premiers éléments est la dysfonction générale du système immunitaire, due notamment aux propriétés régulatrices des LB tumoraux, ainsi qu'aux traitements eux-mêmes (522). Cela se caractérise notamment par un risque accru d'infection et de cancer secondaire, et représente la principale cause de morbi-mortalité (523,524). D'une part, des défauts de l'immunité innée, dont une accumulation de macrophages protumoraux M2 et des altérations fonctionnelles des DC et NK ont été caractérisés. D'autre part, concernant l'immunité adaptative, il a été établi une expansion des Treg dans le sang, ainsi qu'une polarisation accrue en Th2 aux dépens des Th1(522). Les LT CD8⁺ ont un profil épuisé (expression accrue de CTLA-4, LAG-3, PD-1, TIGIT...), et présentent un défaut de prolifération et de cytotoxicité ex vivo, bien que leur production d'IFN γ ou de TNF soit conservée et même accrue (525). L'un des mécanismes décrits de l'immunosuppression dans la LLC est l'augmentation de l'expression de CD39/CD73/A2A et donc de la production et de la signalisation de l'adénosine (526).

L'Ibrutinib est avant tout établi comme un inhibiteur de BTK. Il inhibe donc la signalisation du BCR et ainsi la survie et prolifération des LB, notamment tumoraux. Néanmoins ce médicament peut aussi interférer avec la kinase des LT inductible par l'IL-2 (ITK). De façon directe et indirecte, l'Ibrutinib peut ainsi altérer la fonction et le phénotype des LT. (527,528). Dans la LLC, il semble améliorer la différenciation de LT en mémoire effecteurs et en Th1 effecteurs antitumoraux, pousser les LT vers un phénotype plus activé, réduire le phénotype épuisé des LT CD8⁺ (baisse de l'expression de PD-1 et CTLA-4) et améliorer leur fonction en augmentant notamment leur production de GZMB et de perforine (527,528). Il semble également améliorer la synapse entre les LT et les cellules de la LLC. Il entraîne aussi une réduction des Treg (527,528).

Malgré le succès des inhibiteurs de BTK, certains patients développent des résistances secondaires et rechutent ; des approches d'immunothérapie peuvent donc être envisagées. Il existe peu d'essai clinique d'immunothérapie dans la LLC et les résultats semblent encore limités (522), bien que certains résultats soient intéressants notamment lors de l'association de CAR T-cell ou d'anticorps bispécifiques anti-CD3/CD19 à l'Ibrutinib (527,528). D'autre part, l'effet possible de la résistance à l'Ibrutinib sur le microenvironnement immunitaire est peu décrit. Utiliser le panel de cytométrie spectrale que j'ai mis en place au cours de ma thèse, est donc apparu comme une opportunité afin de décrire avec profondeur le microenvironnement dans la LLC en fonction du statut de réponse à l'Ibrutinib, et de mettre en évidence des cibles d'immunothérapies potentielles.

Résultats

La distribution des populations immunitaires circulantes est relativement conservée lors de la rechute au traitement

Afin d'étudier le microenvironnement immunitaire en fonction du statut de réponse à l'Ibrutinib, nous avons constitué une petite cohorte de 18 patients atteints de LLC-B. 10 patients étaient en réponse complète alors que 8 patients présentaient une rechute. Les caractéristiques des patients sont répertoriées dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques des patients de la cohorte LLC.

ID Patient	Statut maladie	Sexe	Age (années)	Stade Binet	Mutation TP53	Anomalies Cytogénétiques de mauvais pronostic	Statut IGHV	Nbres de lignes antérieures	Type traitement antérieur
LLC 1	RC	M	52	B	non	del11q	muté	2	FCR R-Benda
LLC 2	RC	M	73	B	oui	del17p	non muté	1	R-CHOP
LLC 3	RC	M	68	B	non	Aucune	non muté	1	FCR
LLC 4	RC	F	77	C	non	Aucune	non muté	0	
LLC 5	RC	F	68	C	non	Aucune	non muté	0	
LLC 6	RC	M	72	C	non	Aucune	non muté	1	FCR
LLC 7	RC	F	80	B	non	Aucune	non muté	0	
LLC 8	RC	F	67	B	non	Aucune	non muté	0	
LLC 9	RC	M	79	C	non	Aucune	non muté	1	R-Benda
LLC 10	RC	F	62	B	non	Aucune	non muté	1	FCR
LLC12	Progression	F	84	C	oui	del17p, caryotype complexe	non muté	1	R-Benda
LLC 13	Progression	M	61	C	oui	del17p, caryotype complexe	non muté	2	FCR R-Idelalisib
LLC 14	Progression	F	45	C	non	del11q	non muté	1	FCR
LLC 16	Progression	M	76	C	non	Aucune	non muté	1	R-Benda
LLC 17	Progression	F	89	C	non	Aucune	non muté	1	R-CLB
LLC 18	Progression	M	51	B	non	Aucune	non muté	1	FCR
LLC 19	Progression	M	67	C	oui	del17p, caryotype complexe	non muté	0	
LLC 20	Progression	M	67	C	non	del11q	non muté	1	FCR

Les PBMC ont été isolées du sang circulant et le profil immunitaire a été analysé en utilisant notre panel de 33 paramètres décrits dans l'article 1. De façon importante, afin d'analyser les populations non tumorales, nous avons retiré les LB de ces échantillons par isolation magnétique, avant de procéder au marquage. Les populations de LT, NK, macrophages et DC ont pu être efficacement définies par des analyses non supervisées et supervisées (Figure 1A, B). La distribution des sous-types de cellules était largement conservée indépendamment du statut de réponse, à l'exception d'une augmentation significative de la proportion de LT CD8⁺ parmi les cellules vivantes, dans le cadre de la rechute au traitement (Figure 1B). Les DC présentaient une tendance à la baisse, non significative. Une analyse du phénotype des LT CD8⁺, montre que cette augmentation de la proportion n'était toutefois pas associée à une altération de leur profil naïf, ou à la proportion de LT épuisés PD-1⁺TIM-3⁺, qui d'ailleurs étaient en proportion relativement faible (moins de 2% des LT CD8⁺ totaux), ou encore à leur expression du Granzyme B. Ainsi, ces analyses préliminaires montrent qu'une résistance secondaire à l'Ibrutinib ne semble pas impacter largement la distribution des sous-types immunitaires dans le sang circulant.

Etude de l'expression des checkpoints en fonction du statut de réponse

Afin de déterminer si une stratégie d'immunothérapie par ciblage de checkpoint serait envisageable chez les patients en rechute, nous avons ensuite effectué une analyse supervisée différentielle de ces protéines en fonction du statut de réponse, sur les différentes populations T et NK. Comme décrit dans la littérature, nous avons détecté une proportion non négligeable des LT CD8⁺ exprimant les récepteurs inhibiteurs PD-1 ou TIGIT (Figure 2A, C). A l'inverse les autres récepteurs étudiés étaient faiblement exprimés par les LT CD8⁺, et étaient exprimés préférentiellement par les Treg (CD39, CTLA-4, ICOS) ou les NK (TIM-3, NKG2A) (Figure 2B-H). Néanmoins, aucun de ces marqueurs n'est apparu modulé lors de la rechute au traitement par Ibrutinib. A ce stade de notre étude, il semblerait donc que l'arrêt de la réponse à l'Ibrutinib affecte les LB tumoraux, mais pas les LT ou NK.

Figure 1

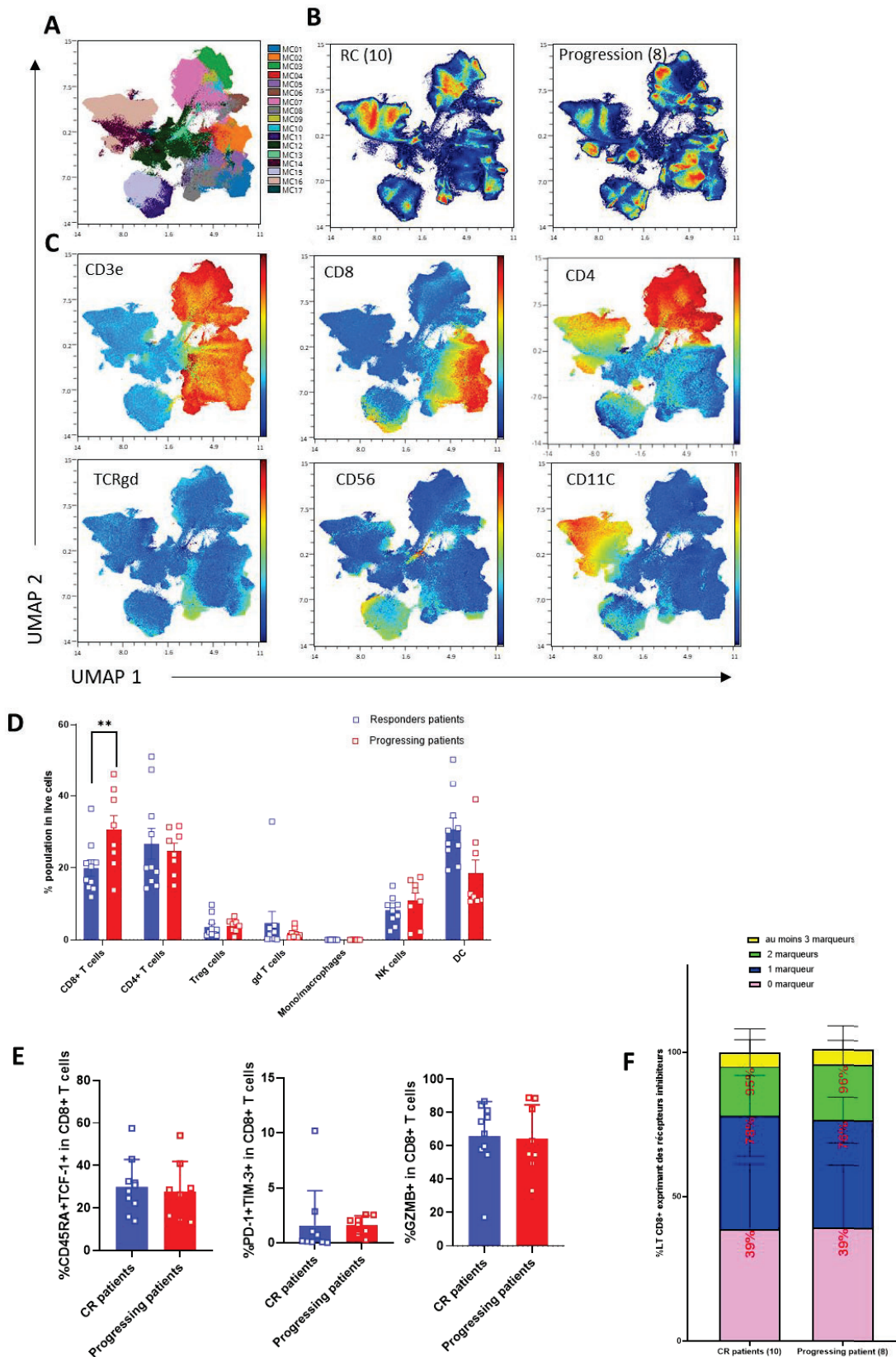


Figure 1. Etude des populations immunitaires dans le sang circulant des patients LLC-B. (A) Projection des clusters (définis par FlowSOM) sur une représentation UMAP, sur tous les échantillons concaténés. (B) Distribution générale des échantillons des patients en réponse complète (CR) ou en progression. (C) Projection de l'expression de différents marqueurs de populations sur UMAP. (D) Proportion des différents types immunitaires après analyses supervisées. CD8+ T cells: CD3+TCRgd-CD8+CD4- ; CD4+ T cells: CD3+TCRgd-CD8-CD4+, Treg cells: CD3+TCRgd-CD8-CD4+Foxp3+ ; gd T cells: CD3+TCRgd+, mono/macrophages: CD3-CD11c-CD163+; NK cells: CD3-CD7+CD56+; DC: CD3-CD163-CD11c+. (E) Proportion de LT CD8+ naïves, épuisées et cytotoxiques. (F) Analyse booléenne de l'expression de checkpoints inhibiteurs par les LT CD8+.

Figure 2

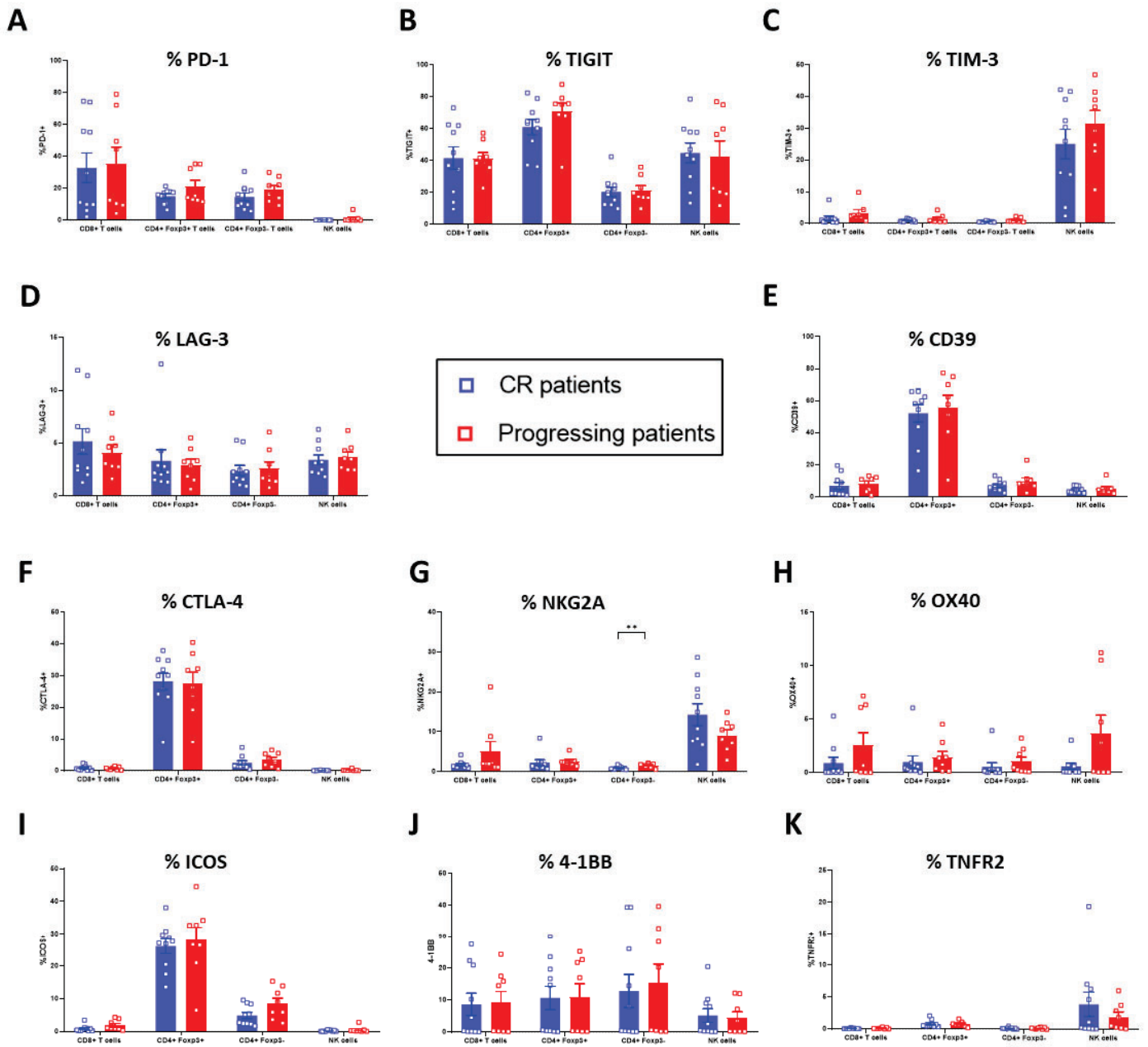


Figure 2. Expression des checkpoints sur les sous-types T et NK. Histogrammes montrant la proportion de cellules exprimant le checkpoint indiqué, en fonction du statut de réponse

Conclusion

Ces études préliminaires dans la LLC démontrent tout d'abord la faisabilité de notre approche de cytométrie spectrale dans une autre pathologie que les PTCL nodaux. De façon importante, il faut noter que l'étude du sang circulant a présenté beaucoup moins de difficultés d'acquisition ou d'analyse que les tissus lymphoïdes.

Ces résultats sont pour l'instant préliminaires et une analyse plus approfondie des différents clusters de cellules est requise, notamment concernant les analyses non supervisées. Toutefois, il semble que globalement, le statut des LT, NK et cellules myéloïdes, ne soit pas fortement impacté par la rechute au traitement. Brièvement, cela pourrait être dû à différents paramètres :

- Les LT et NK, continuent d'être impactés par l'Ibrutinib via la modulation d'ITK, alors que les LB ne répondent plus à l'inhibition de BTK (via des mutations dans BTK ou de sa cible en aval PLGC2) (529).
- Notre analyse se limite aux PBMC, il est possible que des altérations des compartiments T/NK soient observées dans la moëlle osseuse ou les tissus lymphoïdes.
- Les patients ont été prélevés dès le diagnostic de rechute, il est donc possible que des altérations puissent être détectées plus tard dans le temps.

A ce jour, l'immunothérapie dans la LLC s'est concentrée sur l'utilisation d'anticorps ciblant les cellules tumorales (anti-CD20 notamment, plus récemment bi-spécifiques CD3/CD19) et de CAR-T cells anti-CD19 (520,527,528). Nos données présentent un phénotype exhaustif de l'expression des différents checkpoints, et suggèrent une immunostimulation possible, par exemple l'inhibition de TIGIT, fortement exprimé dans les différentes sous-populations, ou la déplétion des cellules CTLA-4⁺, comme nous avons pu le proposer dans les PTCL nodaux. L'analyse approfondie de ces paramètres en fonction du temps, ainsi que des tests fonctionnels ex-vivo et l'utilisation de modèles in vivo, pourraient soutenir cette stratégie.

DISCUSSION

Le décryptage des mécanismes orchestrant les réponses immunitaires face aux cellules cancéreuses a permis au cours des dernières décennies, le développement de nouvelles thérapies anti-tumorales toujours plus efficaces. Cependant, malgré certains progrès, l'immunothérapie dans les PTCL nodaux est encore largement inefficace. Une des étapes importantes dans cette compréhension consiste à documenter la distribution et le phénotype des populations immunitaires, afin de comprendre quelle population cellulaire et/ou quelle molécule de surface peut être exploitée au profit des patients ; il existe un manque évident de connaissances sur ces paramètres dans les PTCL. Notre projet visait donc à accroître notre connaissance du microenvironnement des AITL et des PTCL-NOS, en termes de phénotype profond des cellules immunitaires, afin d'identifier des éventuels défauts et découvrir des potentielles cibles thérapeutiques.

I. Une technique innovante d'étude du microenvironnement immunitaire

A notre connaissance, il s'agit de la première étude ayant analysé le microenvironnement tumoral d'AITL et PTCL-NOS au niveau protéomique par cytométrie spectrale. Cette technologie, en comparaison à la cytométrie de flux conventionnelle, présente l'intérêt d'un plus grand nombre de marqueurs analysés sur un même échantillon avec une meilleure résolution par suppression du signal d'autofluorescence (530). Ceci est un avantage certain au vu du nombre limité de cellules analysables dans les échantillons tumoraux. Elle présente par rapport à la cytométrie de masse, un coût moins important et un nombre de cellules analysées plus important (530). De même en comparaison aux analyses d'ARN-seq, elle a l'intérêt d'analyser l'expression protéique et non celui de l'ARN avec une résolution unicellulaire, et de ce fait de mettre en évidence les protéines réellement exprimées.

Bien que révolutionnaire dans le domaine de la cytométrie, la mise au point de notre panel a nécessité du temps de conception (531): sélection des cibles et des fluorochromes ; titrage ; vérification ; validation. L'une des autres difficultés présentées par cette technique résidait dans les algorithmes de déconvolution qui ont nécessité des ajustements afin d'obtenir des compensations correctes.

II. Une ambiance générale altérée

Nos premières analyses ont permis de mettre en évidence des perturbations générales dans les populations cellulaires immunitaires au sein des PTCL. Ainsi comme attendu les échantillons tumoraux présentaient une réduction des LB au profit des LT (500). Nous avons fait le choix lors de la confection de notre panel de cytométrie de nous intéresser plus particulièrement au LT. De ce fait notre panel ne permettait pas une investigation profonde des LB. Leur réduction n'exclut pas leur ciblage car ils peuvent soutenir les cellules tumorales (532,533). En effet, de par leurs interactions avec les LT TFH de manière physiologique dans les organes lymphoïdes et lors de la formation des TLS dans les cancers, leur rôle dans les PTCL, notamment AITL aurait intérêt à être investigué (271). Dans une étude récente, une baisse d'expression de CD73 et de CXCR5 sur les LB dans l'AITL a été constatée (500). De plus la présence fréquente de LB EBV⁺, parfois clonaux, avec une valeur pronostique, est un argument en faveur de leur potentielle implication (71). La description de rechute ou de progression de lymphome initialement AITL sous la forme de lymphome B argumente une interaction entre ces cellules (534).

Comme il a pu être proposé dans d'autres cancers, nous n'avons pas retrouvé d'inversion du rapport CD4⁺/CD8⁺ au sein du pool des LT dans le PTCL (495,497). Cela pouvant en partie s'expliquer par la nature des cellules tumorales de nos échantillons, qui étaient toutes CD4⁺ et étaient sujettes à une probable prolifération incontrôlée.

Concernant les autres types cellulaires, on pourra noter que la distribution des NK entre les populations CD56^{bright} (associées à la production de cytokines) et CD56^{dim} (fortement cytotoxiques) ne semble pas altérée par rapport aux amygdales contrôles. Ceci est en opposition avec d'autres cancers comme le myélome multiple, où une perte des CD56^{dim} a été décrite (535). Toutefois une partie de ces NK expriment des checkpoints inhibiteurs comme TIM-3, TIGIT ou LAG-3 (article 1, figure 4), suggérant une possible perte de fonction qu'il serait intéressant de mesurer. Les DC quant à elles étaient augmentées de manière significative dans les 2 types de PTCL. Dans les AITL étant donné la prolifération décrite des FDC cela n'est pas surprenant (13), en revanche pour les PTCL-NOS, l'impact des DC n'est pas décrit dans le soutien tumoral et pourrait être étudié de manière plus approfondie.

Dans cette analyse générale des cellules de nos échantillons, notre analyse non supervisée par clusterisation en fonction des marqueurs d'expression caractéristiques de ces différents sous-types cellulaires, a permis de séparer efficacement les échantillons tumoraux des amygdales (Figure S1B). Certes l'échantillon 13 était classé avec les amygdales, mais il s'agissait d'un patient dont les cellules

tumorales exprimaient fortement le marqueur CD20 des LB, le rapprochant de la haute densité en LB des amygdales. Ceci établit bien la nature tumorale des échantillons et renforce l'idée de perturbations immunitaires dans ce contexte. On pourra notamment noter la ressemblance générale entre les PTCL AITL/TFH et les PTCL NOS en comparaison des échantillons non-tumoraux. Il existait bien des différences dans la clusterisation significatives entre les 2 types, mais qui représentaient un cluster fortement présent chez un seul patient. De ce fait notre clusterisation automatique n'a pas permis de séparer les échantillons TFH des échantillons NOS en fonction de l'expression des marqueurs typiques des grandes sous populations immunitaires. Ceci suggère que, bien que les AITL et les NOS constituent deux entités différentes du point de vue pathologique et pronostique, leur impact sur l'homéostasie immunitaire est relativement similaire. Toutefois, on pourra souligner l'hétérogénéité inter-individuelle dans les deux types de PTCL, suggérant la possibilité de thérapies personnalisées pour ces pathologies.

III. Cellules T conventionnelles et tumorales : une frontière incertaine

Nous nous sommes ensuite intéressés aux cellules T CD4⁺ conventionnelles et de ce fait aux cellules tumorales. Concernant les AITL, comme nous avons pu en discuter dans l'introduction leurs cellules tumorales sont dérivées des LT de phénotype TFH (34). En tant qu'organe lymphoïde secondaire, il existe des cellules TFH au sein des amygdales. De manière intéressante notre algorithme de clusterisation a permis à partir des marqueurs des LT CD4⁺ et des checkpoints de séparer les échantillons d'AITL des amygdales, démontrant une différence de phénotype des LT CD4⁺ conventionnels. Les différences de densité des clusters entre les amygdales et les AITL a permis de mettre en évidence que les cellules TFH au sein des AITL ne sont phénotypiquement pas les mêmes que les cellules TFH des amygdales. Elles pouvaient exprimer des marqueurs aberrants tel que CD10, et perdre l'expression de marqueurs pan-T tel que CD7, comme décrit dans la littérature (20). Elles présentaient un état hautement activé comme en témoigne la répression de l'expression de CD45RA et l'expression de nombreux points de contrôle (marqueur de type TFH et autre TIM-3, LAG-3 ou OX40).

Néanmoins, l'une des limites de notre étude est que nous n'avons pas été capables avec certitude d'identifier les cellules tumorales au sein de ces cellules TFH, bien que la plus part puissent être tumorales. La perte d'expression du CD7 ou l'expression aberrante de CD10 peut renforcer cette identification mais en l'absence de certitude, nous prenons le risque d'une sur-interprétation en

incluant des cellules tumorales qui n'en sont pas ou inversement. Cette difficulté est par exemple représentée dans deux échantillons d'AITL (figure 5). Pour le premier cas (figure 5A) les clusters de cellules tumorales semblent évidents, avec une perte d'expression de CD7, une expression d'ICOS et une forte expression de PD-1. En revanche pour le deuxième cas (figure 5B) cette identification est hasardeuse, en effet il existe plusieurs clusters potentiels avec une expression hétérogène de PD-1, ICOS et CD7. Tous ces clusters pourraient représenter des cellules tumorales, mais sans certitude. La clusterisation non supervisée ne les a pas hiérarchisés au même endroit.

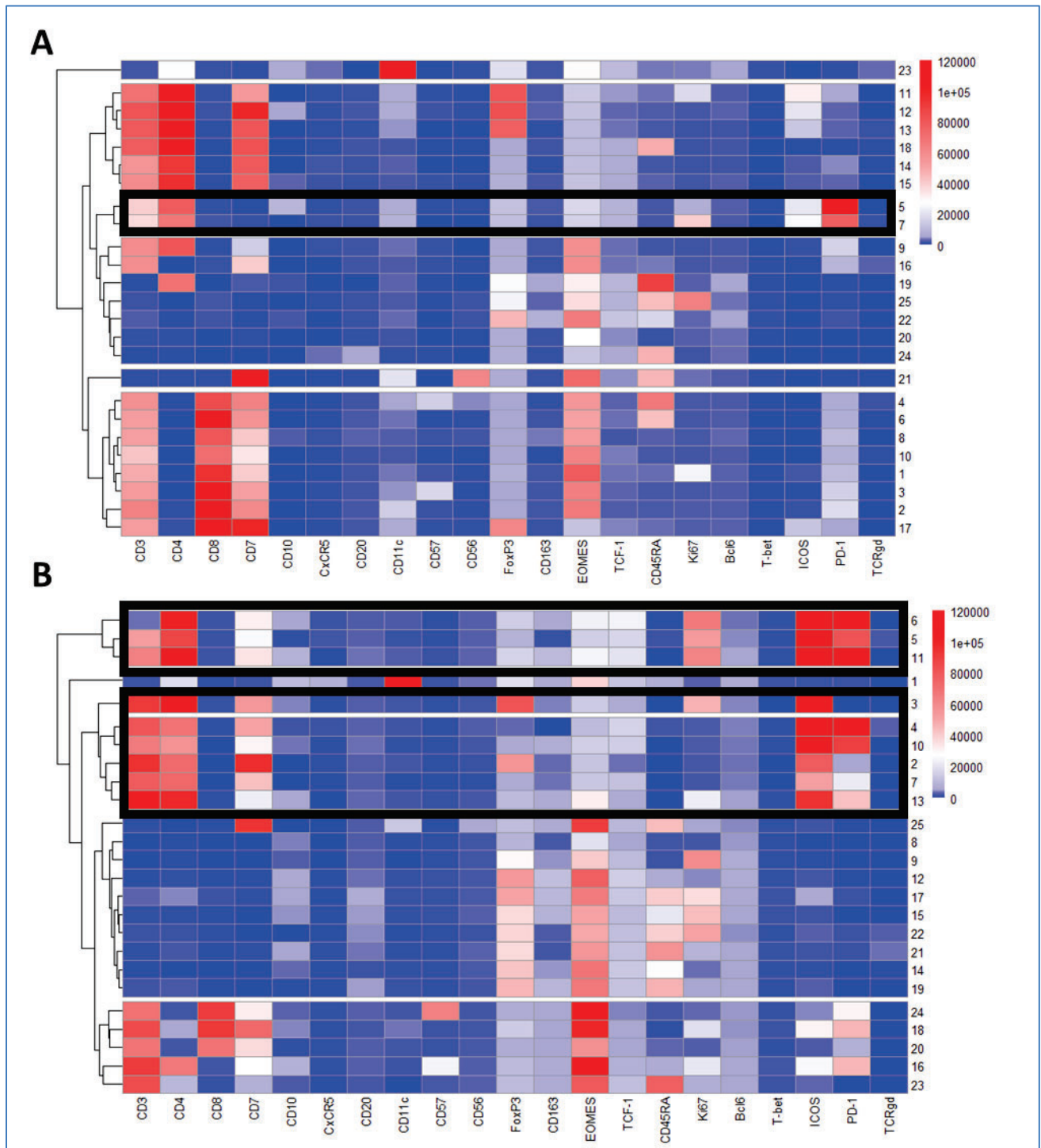


Figure 5. Identification des cellules tumorales difficiles.

(A-B) Heatmap représentant la distribution non supervisée des cellules immunitaires autres que les LB au sein de deux échantillons d'AITL distincts. Les clusters encadrés représentent les potentielles cellules tumorales.

Une étude du Memorial Sloan Kettering observe un niveau d'expression de PD-1 plus fort par les cellules tumorales par rapport aux autres cellules TFH au sein des AITL, indiquant que ce niveau d'expression pourrait permettre d'identifier les cellules tumorales (28). De notre côté nous n'avons pas retrouvé de population PD-1^{high} au sein des échantillons ou en comparaison aux amygdales (figure 6),

et ce marqueur ne nous a pas permis de différencier les cellules tumorales des autres cellules TFH avec certitude. Il n'est pas exclu que l'ensemble de cellules PD-1⁺ au sein de nos échantillons soient toutes des cellules tumorales et que le niveau d'expression de PD-1 dans les amygdales ne soit pas représentatif de celui des cellules TFH des ganglions sains.

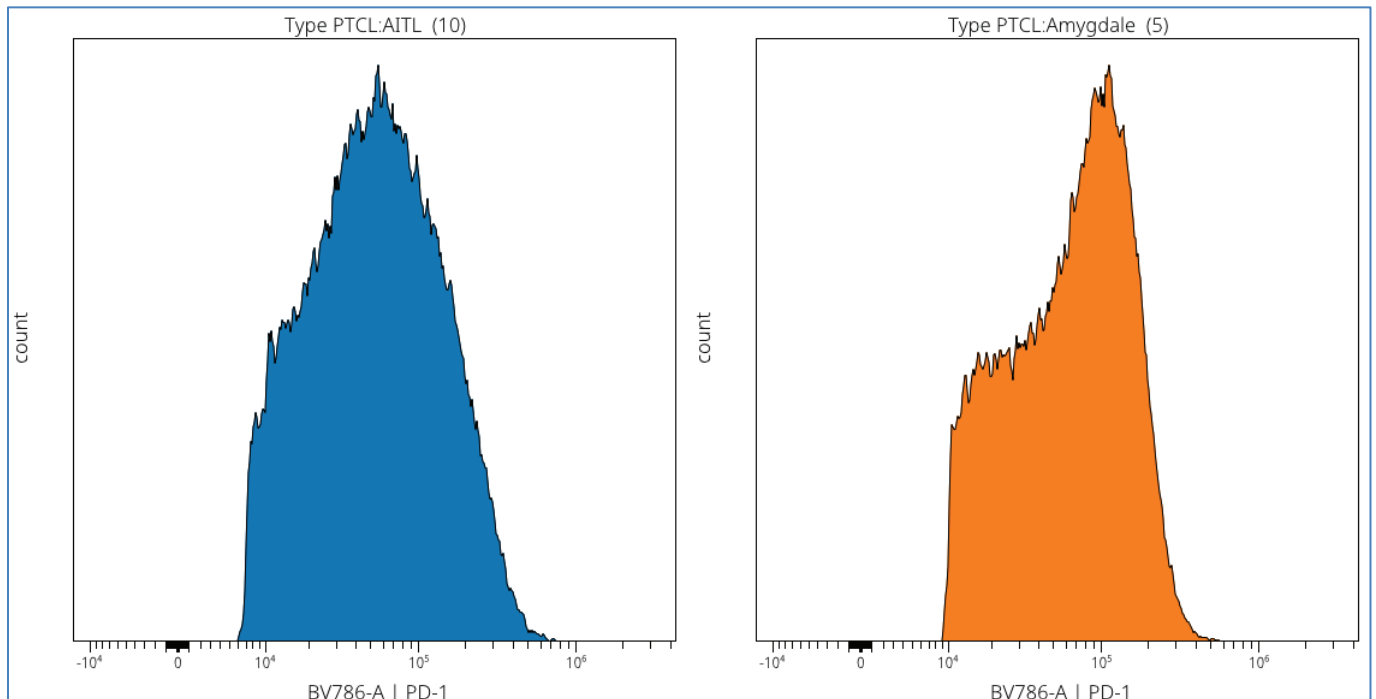


Figure 6. Niveau d'expression de PD-1 au sein des AITL et Amygdales.

Cette incapacité d'identification des cellules tumorales était majorée dans les PTCL-NOS. En effet, bien que la perte ou la réduction des marqueurs pan-T puissent apporter un argument dans leur identification, l'absence d'autre marqueur phénotypique spécifique n'a pas permis leur reconnaissance.

Cette limite technologique reflète bien la difficulté de pouvoir isoler les cellules tumorales des PTCL en l'absence de NGS avec séquençage du TCR ou d'identification de mutation telles que RHOA ou TET2 (42,55,536). L'une des solutions récemment développées pour la cytométrie en flux est l'anticorps liant TRBC1, c'est-à-dire l'un des deux domaines constants de la chaîne β du TCR (537). Cependant cet anticorps peut reconnaître tout développement clonal T qu'il s'agisse ou non d'une population tumorale. Ainsi il peut reconnaître potentiellement les populations clonales antitumorales se développant dans le microenvironnement résultant de l'activation immunitaire des LT « normaux ». De même, certains clones de LT présentent de faible niveau d'expression de TRBC1 faussant sa négativité. Cette technique nécessite également de nombreuses mises au point, dont le niveau de

sensibilité d'une population clonale, ayant relevé la présence de clones chez des patients sains. Une des solutions pour contourner ce problème serait donc d'utiliser une technologie combinant ADN/ARN et protéine, comme le CITE-Seq par exemple.

IV. Une immunosuppression généralisée dans le PTCL

Le rôle des Treg dans les PTCL est encore débattu (498,499)... bien qu'il s'agirait du seul cancer (à l'exception de quelques cancers colorectaux) dans lequel l'accumulation de Treg ne serait pas délétère. Contrairement à certains rapports (499), nous avons observé dans nos échantillons une augmentation de leur proportion par rapport aux amygdales. De manière intéressante les Treg présents étant majoritairement CD45RA et T-cell factor 1 (TCF1) négatifs, étaient donc activés, suggérant une immunosuppression active (292).

Nous savons que l'issue du cancer est généralement liée à la qualité des réponses des lymphocytes T CD8⁺. Celles-ci sont souvent atténuées dans le TME, notamment par l'acquisition d'un phénotype épuisé se définissant par l'accumulation de l'expression de marqueurs inhibiteurs (293,315,538). Dans le PTCL, nous avons pu mettre en évidence un changement de distribution des sous-types des lymphocytes T CD8⁺ du TME dans les AITL et les PTCL-NOS. En effet, il y a une perte des cellules naïves (CD45RA⁺TCF1⁺GzmB⁻) qui devraient être retrouvées dans un ganglion lymphatique. De plus la plupart des lymphocytes T CD8⁺ dans l'AITL et le PTCL NOS expriment au moins un checkpoint inhibiteur, et un enrichissement très important des LT CD8⁺ exprimant au moins 3 marqueurs inhibiteurs a été mis en évidence. Plus de 30% des LT CD8⁺ exprimaient au moins 3 checkpoints inhibiteurs pour moins de 10% dans les amygdales. Ces résultats soulignent un probable épuisement de ces LT. En effet, des analyses *in vitro* de LT CD8⁺ de patients, spécifiques du mélanome ont montré que ceux co-exprimant PD-1 et TIM-3 étaient non fonctionnels par rapport au LT CD8⁺ n'exprimant que PD-1 ou aucun des ces 2 checkpoints (328). Leur production de cytokines de type IFN-g, TNF et IL-2 était réduite. Ces résultats suggèrent qu'un processus d'épuisement actif pourrait avoir lieu dans les tissus du PTCL. Ceci est conforme aux observations faites chez des patients atteints de TCL cutané et d'autres lymphomes non hodgkiniens (539–541). Néanmoins, il est important de noter que notre étude se limite à une description phénotypique et non pas fonctionnelle, ce qui empêche de tirer des conclusions définitives quant à l'épuisement des CD8⁺. Deux types d'expériences auraient pu être envisagés si nous avions eu accès à plus d'échantillons et surtout à un plus grand nombre de cellules par échantillons :

- une mesure de la prolifération et de la capacité fonctionnelle *in vitro*, des CD8⁺ de PTCL en comparaison à des CD8⁺ de donneurs sains (328).
- une analyse du profil épigénétique des CD8⁺, par exemple par ATAC-Seq (Assay for transposase-Accessible Chromatine with high-throughput sequencing). Il a en effet été montré que l'épuisement est caractérisé par une signature d'ouverture/fermeture de la chromatine très spécifique (542).

Cette association de l'expansion des LT Treg activés et des LT CD8⁺ au profil phénotypique épuisé suggère qu'une forte immunosuppression se produit dans les PTCL nodaux soulignant la possibilité et la nécessité de stratégies d'immunothérapies dans ces conditions.

V. Des cibles potentielles : choisir l'élus ?

Comme nous l'avons discuté en introduction, l'une des difficultés dans le développement des immunothérapies ciblant les checkpoints, quel que soit le cancer, est leur expression hétérogène sur des populations cellulaires aux fonctions antagonistes dans la lutte antitumorale. De plus une autre difficulté s'ajoute dans le cadre des lymphomes T : la possible action à double tranchant de ces immunothérapies. Elles peuvent à la fois agir sur les cellules du microenvironnement tumoral et sur les cellules tumorales elles-mêmes. Les résultats discordants des anti-PD-1 dans les PTCL et les ALL-T, avec l'observation d'hyperprogression, en sont la preuve (508–511). C'est pourquoi outre la description des états des cellules immunitaires dans le PTCL, l'un de nos objectifs était d'identifier des molécules de points de contrôle exploitables, c'est-à-dire les récepteurs de surface exprimés par les cellules T cytotoxiques et/ou les cellules NK mais pas par les cellules malignes et Treg, ou vice versa.

A. Duplicité et fourberie

Comme attendu PD-1 était fortement exprimé par les différentes sous-populations cellulaires, ne représentant pas une cible attrayante et pouvant expliquer l'hyperprogression détectée chez certains patients suite au blocage de PD-1. Les mêmes constatations en termes d'expression ont été faites pour d'autres checkpoints. Nous avons observé que TIGIT et TIM-3 étaient largement exprimés à la fois par les cellules tumorales, les Treg et les cellules antitumorales (cellules T CD8⁺, cellules NK). Cette large expression pourrait annuler le potentiel thérapeutique dans les PTCL, des anticorps bloquants actuellement en cours de développement clinique dans les tumeurs malignes solides et hématologiques (543).

B. Des alliés potentiels chez l'ennemi

En revanche, d'autres marqueurs de surface présentaient une expression spécifique. La première cible d'intérêt que nous avons identifiée fut CTLA-4. Tout d'abord il est intéressant de noter que dans une cohorte d'AITL et d'ALCL, l'analyse d'ARN-seq a identifié la surexpression de CTLA-4 comme marqueur de mauvais pronostic sur la SG (544). Ensuite dans notre étude son expression était beaucoup plus élevée sur les LT CD4⁺ (comprenant les cellules tumorales et les cellules Treg) que sur les autres sous-ensembles, dont les CD8⁺ et NK. CTLA-4 peut donc représenter une cible thérapeutique attractive pour le traitement des PTCL. Cependant pour cela, en tant que checkpoint identifié comme inhibiteur, les AcM ne devraient pas lever cette inhibition dans ces cellules mais induire leur déplétion. Plus précisément, cela nécessiterait l'utilisation d'anticorps monoclonaux déplétant grâce à l'utilisation de molécules IgG1 optimisées pour l'ADCC et la phagocytose à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) (545). Concernant les AcM anti-CTLA-4, leurs rôles et effets chez la souris semblent bien compris. Il a été démontré dans des études murines précliniques que l'activité de ces AcM était due à la déplétion sélective des Treg intra-tumoraux via l'ADCC et dépendamment des macrophages exprimant le récepteur Fcγ (299). Cependant l'effet déplétant chez l'homme des AcM anti-CTLA-4 actuellement utilisés en clinique, notamment l'Ipilimumab et le Tremelimumab, est largement débattu et ce malgré qu'ils puissent se lier au récepteur Fc et induire l'ADCC (300–302,546). Plusieurs équipes travaillent à optimiser les différents AcM et notamment les anti-CTLA-4. Ainsi différentes stratégies ont été utilisées pour créer des mAb IgG1 anti-CTLA4 dotés de fortes propriétés d'ADCC et d'ADCP et/ou de fortes capacités de déplétion des Treg médiés par le récepteur Fcγ (547,548). Ces AcM ont démontré dans des modèles précliniques une plus grande capacité de déplétion sélective des Treg et une plus grande capacité à provoquer une immunité antitumorale (547,548). Des essais cliniques précoces sont en cours chez l'homme dans les tumeurs solides avancées. Ces AcM méritent une attention particulière pour le traitement du PTCL et devraient être testés. Il est à noter, de façon surprenante, que l'inhibition/déplétion de CTLA-4 n'a pas été testée dans le PTCL à notre connaissance.

Deux autres ciblent présentent un intérêt de par leur expression restreinte aux Treg et LT conventionnels : ICOS et OX-40. Notamment ICOS qui était retrouvé à la surface d'environ 50% des Treg et 70% des LT conventionnels. Nos résultats viennent soutenir l'observation d'une expression forte d'ICOS par les PTCL AITL/TFH (26). Or il a été démontré que MEDI-570, un mAb IgG1 afucosylé anti-ICOS, induisait une déplétion des LT CD4⁺ exprimant ICOS sans dépler les LT CD8⁺ totaux chez le singe cynomolgus (303). Récemment les résultats de l'étude de phase précoce NCT02520791, évaluant MEDI-570 dans le cadre de PTCL en R/R, ont été publiés (507). 23 patients

ont été inclus dont 16 AITL et 1 PTCL-TFH. Le traitement a été bien toléré sans toxicité limitant la dose (DLT) et le TRG dans le groupe AITL était de 44% avec une réduction des LT CD4⁺ ICOS⁺.

À ce jour et à notre connaissance, les mAb OX-40 en cours de développement ont une fonction agoniste et ne devraient pas être recommandés pour le traitement du PTCL. En revanche le développement d'AcM déplétant devrait être envisagé.

Ces résultats sont encourageants pour le futur des PTCL. En effet nos résultats démontrant l'expression de manière spécifique de cibles sur les cellules tumorales et les Treg associés aux résultats de leur possible déplétion et des premiers résultats cliniques de MEDI-570 sont autant d'arguments en faveur d'une telle stratégie.

En plus de ces agents ciblant les lymphocytes T, il est intéressant de discuter de NKG2A. Comme décrit dans d'autres situations dans la littérature, nos résultats ont retrouvé que son expression était largement limitée aux cellules NK (549). Les AcM anti-NKG2A bloquants, actuellement en évaluation clinique dans les cancers solides, entraînent une levée d'inhibition de ces cellules cytotoxiques et un contrôle des tumeurs dans les modèles précliniques murins (549). Ils pourraient représenter une future voie thérapeutique dans le PTCL.

C. CD39 : un avenir prometteur

Comme nous en avons discuté en introduction l'action combinée du CD39 et du CD73, qui conduit à la production d'adénosine, a été largement décrite pour ses fonctions immunosuppressives favorisant les tumeurs dans les cancers solides (550). Il a été constaté que l'inhibition du CD39 revigorait l'activité des lymphocytes T cytotoxiques dans des modèles précliniques de mélanome ou de sarcome, entre autres (551). L'expression de CD39 était également augmentée dans différentes hémopathies malignes, y compris les cancers dérivés des lymphocytes T tels que l'ATLL ou le syndrome de Sézary (SS) (552,553). Il a été démontré qu'une expression élevée de CD39 était associée à un mauvais pronostic dans les DLBCL et le myélome multiple (554,555). L'expression de CD39 sur les lymphocytes T était corrélée à la gravité de la maladie chez les patients atteints de LLC (556). En raison de cette association avec la progression tumorale, le potentiel thérapeutique de l'inhibition du CD39 a été testé dans les cancers du sang. Par exemple, les anticorps ciblant CD39 ont potentialisé l'efficacité thérapeutique du transfert de lymphocytes T dans un modèle humanisé de lymphome à cellules B (557), tandis que l'ARL67156 et le POM-1, deux inhibiteurs de l'ectonucléotidase ayant une forte affinité pour CD39, ont amélioré la fonction des lymphocytes T dans les échantillons de

patients atteints de lymphome folliculaire et de myélome multiple (555,558). L'inhibition de CD73 ou d'A2AR a augmenté la prolifération des lymphocytes T non tumoraux dans le SS *in vitro* (559).

Dans notre étude nous révélons que CD39 est fortement exprimé dans les PTCL notamment par les LT alors qu'il est principalement exprimé par les DC et NK dans les PBMC et amygdales saines. Son expression était très enrichie dans les LT CD8⁺ activés par rapport au LT CD8⁺ naïfs. De plus son niveau d'expression s'est avéré pronostic dans notre cohorte de 43 patients présentant un AILT. Cependant sa valeur pronostique ne sortait qu'après optimisation du cut-off d'expression de CD39 par les LT *via* une analyse de la courbe ROC, en partie probablement du fait de la forte expression de CD39 sur les CD8⁺ dans la majorité des échantillons de notre cohorte d'AILT, comme le montre la figure 7. Une évaluation sur une cohorte de validation externe s'avère nécessaire afin de valider sa valeur pronostique.

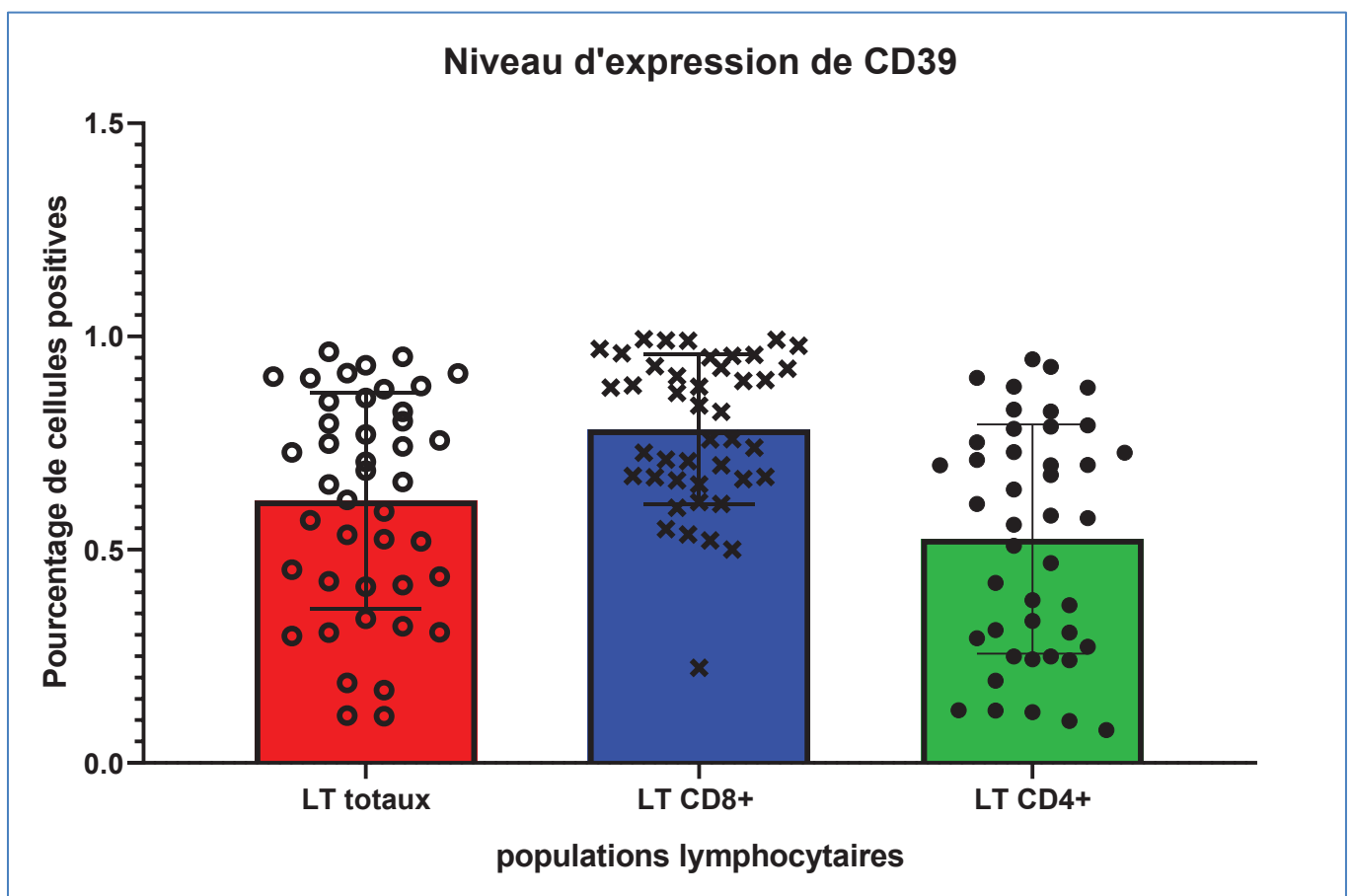


Figure 7. Niveau d'expression de CD39 sur les lymphocytes T des AILT en IHC.

Ces données suggèrent une activité immunosuppressive de CD39 dans les PTCL en étendant désormais ses propriétés tumorales aux PTCL et qu'il pourrait représenter une cible prometteuse. Dans

ce cadre nous avons effectué des tests in vitro de prolifération et de cytotoxicité des cellules issues de biopsies de PTCL nodaux (n=4) en présence d'ATP +/- d'inhibiteur de CD39 (ARL-67156) (figure 8). L'ajout de l'inhibiteur a permis d'augmenter significativement la prolifération des LT CD8⁺ (figure 8 A-B) et de restaurer leur cytotoxicité, reflétée par leur production de GZMB, à la limite de la significativité. Il s'agit de premiers résultats prometteurs in vitro du potentiel d'inhibition de CD39. Cependant il convient de vérifier ces résultats et d'investiguer de manière plus approfondie l'impact de ce ciblage sur les LT conventionnels et plus spécifiquement sur les LT tumoraux. En effet dans nos tests nous n'avons pas noté d'augmentation de la prolifération des LT conventionnels, mais nous n'étions pas capables, comme discuté précédemment, d'identifier les cellules tumorales.

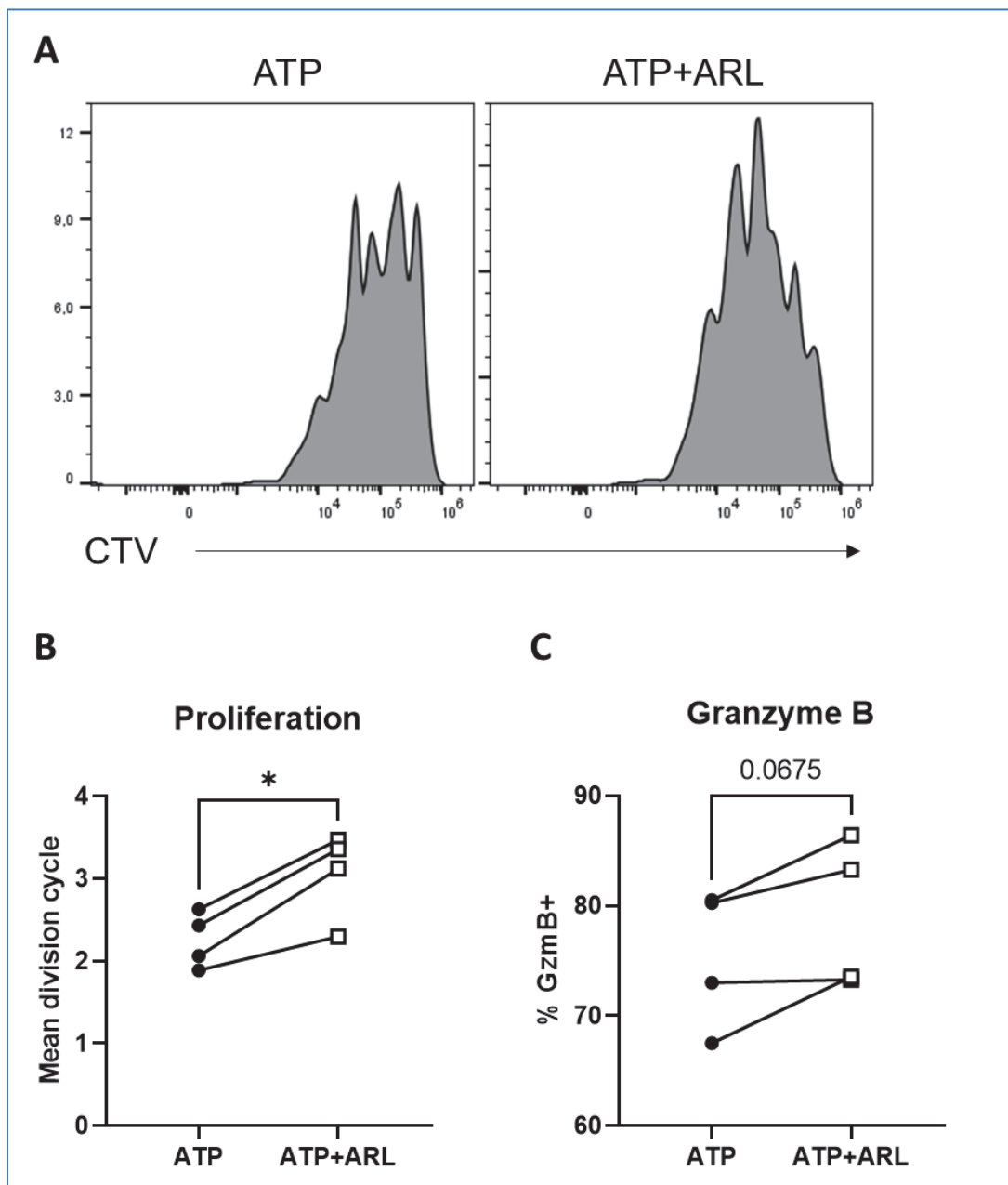


Figure 8. L'inhibition de CD39 restaure la prolifération et la cytotoxicité des LT CD8⁺ des PTCL nodaux. *in vitro* de cellules en suspension marquées au CellTrace Violet (CTV) de biopsie de PTCL nodaux (n=4), 2 expériences distinctes, en présence d'adénosine triphosphate (ATP) +/- d'inhibiteur de CD39 (ARL-67156). (A) Mesure du CTV des LT CD8⁺ et (B) calcul du cycle de division moyen des LT CD8⁺. (C) Mesure de l'expression du GZMB par les LT CD8⁺.

Nous proposons donc que l'expression de CD39 puisse être évaluée par IHC et/ou cytométrie en flux en tant que facteur pronostique dans l'AITL. De plus, les patients atteints de PTCL pourraient bénéficier des agents bloquant le CD39 actuellement en cours de développement clinique pour d'autres cancers (476).

VI. Conclusion et perspectives

En conclusion notre étude met en lumière un changement du microenvironnement dans les PTCL nodaux de type AITL et PTCL-NOS, avec une accumulation de LT CD8⁺ au profil épuisé et de Treg, au détriment des LB, argumentant une possibilité et une nécessité de cibler et de lever ces défauts via les immunothérapies. Notre étude révèle différentes cibles potentielles telles que CTLA-4, ICOS et OX40 dont l'expression par les cellules tumorales et les Treg nécessiterait l'utilisation d'AcM déplétant, et révèle des cibles à éviter tel que PD-1. Enfin elle étend le rôle pro tumoral de CD39 au PTCL et indique son possible ciblage thérapeutique et son utilisation en tant que marqueur pronostique.

Comme nous avons pu en discuter, notre étude présente une limite majeure, intrinsèque à la cytométrie, dans l'incapacité à identifier avec certitude les cellules tumorales au sein des LT CD4⁺ conventionnels. Bien que les LT CD8⁺ ont longtemps été considérés comme l'élément majeur de l'immunité antitumorale, l'implication des LT CD4⁺ conventionnels est de plus en plus mise en avant (229). Outre l'intérêt pour l'étude des LT CD4⁺ « normaux », un autre élément important qui apporterait une identification certaine de la population tumorale serait la possibilité d'identifier une cible exprimée essentiellement par celle-ci. En effet à l'heure actuelle cela représente un frein important dans le développement d'autres thérapies et notamment les CAR T-cells dans les PTCL. En effet le fratricide est l'un des facteurs limitant, face auquel des stratégies sont élaborées tel que le développement de CAR restreint à un domaine de la chaîne β du TCR (514). Nous pourrions également envisager le développement de CAR T-cells exprimant en sus un récepteur inhibiteur qui reconnaîtrait une protéine exprimée par les cellules T normales et non exprimée par les cellules tumorales, par exemple les marqueurs dont elles perdent l'expression comme CD7.

Notre étude s'est limitée à des analyses *ex vivo* et *in vitro*, des études *in vivo* sont nécessaires. Le développement récent de différents modèles murins, basés sur les anomalies moléculaires retrouvées chez les patients (57,58,63,64), présentés dans l'introduction à la section I.B.2.b)(3)e), avec des caractéristiques d'AITL, devrait permettre d'étudier rapidement les cibles potentielles que nous proposons. De même le couplage de ces modèles aux modèles de souris humanisées CD39/CD73 pourra permettre des essais précliniques des AcM bloquant cette voie (551). Il serait particulièrement intéressant d'induire une mutation de *Tet2* et *Rhoa*^{G17V} spécifiquement dans les LT CD4⁺ des souris humanisées CD39/CD73, par exemple *via* un knock-in par CRISPR/Cas9. Cependant les modèles précliniques sont encore absents pour une grande majorité des PTCL. L'absence de modèle a été longtemps et reste encore un problème dans l'étude préclinique des PTCL nodaux. Dans ces conditions

il est possible d'envisager des modèles de xénogreffe de tumeur provenant de patient chez des souris immunodéficientes. Cependant le maintien des conditions du TME d'origine de ces modèles est incertain (560).

D'autres nombreuses questions restent encore à élucider. Nous nous sommes principalement concentrés sur le phénotype profond des LT, or comme pour tout cancer le microenvironnement des PTCL est constitué d'une multitude de cellules immunitaires. Ainsi comme nous avons commencé à en discuter précédemment il serait opportun d'étudier plus en profondeur le rôle des LB, des FDC et des NK. Les premiers interagissent avec les LT TFH dans un contexte physiologique dans les AITL ils semblent représenter un élément clé : charge EBV, prolifération clonale (71)... Pour les seconds, les FDC, leur prolifération est spécifique des AITL et pourrait représenter un soutien à leur développement (13). D'autant plus que l'équipe de Pritchett et al. a mis en évidence une augmentation de l'expression de XCL2/XCL1 par les LT CD8⁺ infiltrant les AITL, dont le récepteur est exprimé par les DC et entre en jeu dans l'activité antitumorale médiée par les DC (500). Pour les troisièmes, notre analyse s'est limitée à un seul récepteur NK, NKG2A, il serait nécessaire d'étendre l'analyse du phénotype et de la fonction des NK dans les PTCL et tout particulièrement dans les AITL. En effet l'équipe de Nicolas Dulphy a récemment montré que les mutations de *TET2* associées au syndrome myélodysplasique, également retrouvaient dans les AITL, affectaient le phénotype et la fonction des NK (561). Nous pourrions par exemple comparer le profil phénotypique (à l'aide d'un nouveau panel de cytométrie), l'état de méthylation des gènes clés de l'activité cytotoxique des NK et de l'expression des récepteurs NK, et l'état fonctionnel des NK entre des amygdales, des AITL non mutés *TET2* et des AITL mutés *TET2*. De même nous pourrions via les modèles murins évaluer l'impact de l'utilisation d'agent hypométhylant sur le profil des NK.

D'autre part, notre étude ne permettait pas l'analyse des relations inter-cellulaires. En effet la cytométrie nécessite l'utilisation de cellules en suspension pour marquage et analyse. Or de nombreuses études récentes indiquent que c'est l'impact des cellules immunitaires au contact des cellules tumorales qui joue un rôle primordial (562). Il existe donc une nécessité d'étude spatiale du microenvironnement immunitaire dans les PTCL. Ainsi il serait intéressant d'utiliser des techniques multiparamétriques de protéomique (CODEX) et de transcriptomique (Nanostring GeoMX et Nanostring SMI) spatiale déjà mise au point dans d'autres types de lymphome tel que le lymphome T cutané (562–564).

Enfin, notre étude s'est limitée à l'analyse d'échantillons au diagnostic et la taille restreinte de la cohorte FACS n'a pas permis de comparaison entre les patients répondeurs au traitement de première

ligne par rapport aux non répondeurs. Une cohorte plus large permettrait de détecter les différences de statut des LT et d'expression de checkpoint entre les patients chimio sensibles et les autres. De même une comparaison entre l'état du microenvironnement au diagnostic et à la rechute permettrait l'identification des mécanismes d'échappement et les marqueurs potentiels à cibler en association au CHOP de 1^{ère} ligne.

En résumé, mes travaux de thèse révèlent une forte perturbation immunitaire dans les lymphomes T et indiquent un certain nombre d'axes de recherche pour améliorer le diagnostic, le suivi et le traitement des PTCL nodaux.

Références Bibliographiques

1. ES J, NL H, H S, JW V. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues [Internet]. [cited 2023 Sep 16]. Available from: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Pathology-And-Genetics-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2001>
2. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1720–48.
3. Vose J, Armitage J, Weisenburger D, International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Sep 1;26(25):4124–30.
4. Laurent C, Baron M, Amara N, Haioun C, Dandoit M, Maynadié M, et al. Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Jun 20;35(18):2008–17.
5. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy with dysproteinaemia. *Lancet Lond Engl*. 1974 Jun 1;1(7866):1070–3.
6. Mourad N, Mounier N, Brière J, Raffoux E, Delmer A, Feller A, et al. Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood*. 2008 May 1;111(9):4463–70.
7. Federico M, Rudiger T, Bellei M, Nathwani BN, Luminari S, Coiffier B, et al. Clinicopathologic characteristics of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: analysis of the international peripheral T-cell lymphoma project. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Jan 10;31(2):240–6.
8. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1989 Nov;7(11):1630–6.
9. Lachenal F, Berger F, Ghesquières H, Biron P, Hot A, Callet-Bauchu E, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: clinical and laboratory features at diagnosis in 77 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2007 Sep;86(5):282–92.
10. Crickx E, Poullot E, Moulis G, Goulabchand R, Fieschi C, Galicier L, et al. Clinical spectrum, evolution, and management of autoimmune cytopenias associated with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2019 Jul;103(1):35–42.
11. Dogan A, Attygalle AD, Kyriakou C. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2003 Jun;121(5):681–91.
12. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, Munson P, Liu H, Du MQ, et al. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood*. 2002 Jan 15;99(2):627–33.

13. de Leval L, Gaulard P. Pathobiology and molecular profiling of peripheral T-cell lymphomas. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;272–9.
14. de Leval L, Gaulard P. Pathology and biology of peripheral T-cell lymphomas. *Histopathology*. 2011 Jan;58(1):49–68.
15. Vega F, Amador C, Chadburn A, Hsi ED, Slack G, Medeiros LJ, et al. Genetic profiling and biomarkers in peripheral T-cell lymphomas: current role in the diagnostic work-up. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2022 Mar;35(3):306–18.
16. de Leval L. Approach to nodal-based T-cell lymphomas. *Pathology (Phila)*. 2020 Jan;52(1):78–99.
17. Niino D, Komohara Y, Murayama T, Aoki R, Kimura Y, Hashikawa K, et al. Ratio of M2 macrophage expression is closely associated with poor prognosis for Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). *Pathol Int*. 2010 Apr;60(4):278–83.
18. Tripodo C, Gri G, Piccaluga PP, Frossi B, Guarnotta C, Piconese S, et al. Mast cells and Th17 cells contribute to the lymphoma-associated pro-inflammatory microenvironment of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2010 Aug;177(2):792–802.
19. Lee SS, Rüdiger T, Odenwald T, Roth S, Starostik P, Müller-Hermelink HK. Angioimmunoblastic T cell lymphoma is derived from mature T-helper cells with varying expression and loss of detectable CD4. *Int J Cancer*. 2003 Jan 1;103(1):12–20.
20. de Leval L, Parrens M, Le Bras F, Jais JP, Fataccioli V, Martin A, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma is the most common T-cell lymphoma in two distinct French information data sets. *Haematologica*. 2015 Sep;100(9):e361-364.
21. Karube K, Aoki R, Nomura Y, Yamamoto K, Shimizu K, Yoshida S, et al. Usefulness of flow cytometry for differential diagnosis of precursor and peripheral T-cell and NK-cell lymphomas: analysis of 490 cases. *Pathol Int*. 2008 Feb;58(2):89–97.
22. Stacchini A, Demurtas A, Aliberti S, Francia di Celle P, Godio L, Palestro G, et al. The usefulness of flow cytometric CD10 detection in the differential diagnosis of peripheral T-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2007 Nov;128(5):854–64.
23. Attygalle AD, Chuang SS, Diss TC, Du MQ, Isaacson PG, Dogan A. Distinguishing angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified, using morphology, immunophenotype and molecular genetics. *Histopathology*. 2007 Mar;50(4):498–508.
24. Bossard C, Dobay MP, Parrens M, Lamant L, Missiaglia E, Haioun C, et al. Immunohistochemistry as a valuable tool to assess CD30 expression in peripheral T-cell lymphomas: high correlation with mRNA levels. *Blood*. 2014 Nov 6;124(19):2983–6.
25. Horwitz S, O'Connor OA, Pro B, Illidge T, Fanale M, Advani R, et al. Brentuximab vedotin with chemotherapy for CD30-positive peripheral T-cell lymphoma (ECHOLON-2): a global, double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2019 Jan 19;393(10168):229–40.
26. Marafioti T, Paterson JC, Ballabio E, Chott A, Natkunam Y, Rodriguez-Justo M, et al. The inducible T-cell co-stimulator molecule is expressed on subsets of T cells and is a new marker of lymphomas of T follicular helper cell-derivation. *Haematologica*. 2010 Mar;95(3):432–9.

27. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2006 Jul;30(7):802–10.
28. Yabe M, Gao Q, Ozkaya N, Huet S, Lewis N, Pichardo JD, et al. Bright PD-1 expression by flow cytometry is a powerful tool for diagnosis and monitoring of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood Cancer J.* 2020 Mar 6;10(3):32.
29. Grogg KL, Attygalle AD, Macon WR, Remstein ED, Kurtin PJ, Dogan A. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a neoplasm of germinal-center T-helper cells? *Blood.* 2005 Aug 15;106(4):1501–2.
30. Yu H, Shahsafaei A, Dorfman DM. Germinal-center T-helper-cell markers PD-1 and CXCL13 are both expressed by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2009 Jan;131(1):33–41.
31. Bisig B, Thielen C, Herens C, Gofflot S, Travert M, Delfau-Larue MH, et al. c-Maf expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma reflects follicular helper T-cell derivation rather than oncogenesis. *Histopathology.* 2012 Jan;60(2):371–6.
32. Morito N, Yoh K, Fujioka Y, Nakano T, Shimohata H, Hashimoto Y, et al. Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res.* 2006 Jan 15;66(2):812–9.
33. Piccaluga PP, Agostinelli C, Califano A, Carbone A, Fantoni L, Ferrari S, et al. Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res.* 2007 Nov 15;67(22):10703–10.
34. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, Reynies A de, Huang YL, Delsol G, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood.* 2007 Jun 1;109(11):4952–63.
35. Ellyard JI, Chia T, Rodriguez-Pinilla SM, Martin JL, Hu X, Navarro-Gonzalez M, et al. Heterozygosity for Roquinsan leads to angioimmunoblastic T-cell lymphoma-like tumors in mice. *Blood.* 2012 Jul 26;120(4):812–21.
36. Glasmacher E, Hoefig KP, Vogel KU, Rath N, Du L, Wolf C, et al. Roquin binds inducible costimulator mRNA and effectors of mRNA decay to induce microRNA-independent post-transcriptional repression. *Nat Immunol.* 2010 Aug;11(8):725–33.
37. Yu D, Tan AHM, Hu X, Athanasopoulos V, Simpson N, Silva DG, et al. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature.* 2007 Nov 8;450(7167):299–303.
38. Lukes RJ, Tindle BH. Immunoblastic lymphadenopathy. A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1975 Jan 2;292(1):1–8.
39. Nathwani BN, Rappaport H, Moran EM, Pangalis GA, Kim H. Malignant lymphoma arising in angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Cancer.* 1978 Feb;41(2):578–606.
40. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelényi G, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet Lond Engl.* 1988 Feb 6;1(8580):292–3.
41. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994 Sep 1;84(5):1361–92.

42. Weiss LM, Strickler JG, Dorfman RF, Horning SJ, Warnke RA, Sklar J. Clonal T-cell populations in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Am J Pathol.* 1986 Mar;122(3):392–7.
43. Tobinai K, Minato K, Ohtsu T, Mukai K, Kagami Y, Miwa M, et al. Clinicopathologic, immunophenotypic, and immunogenotypic analyses of immunoblastic lymphadenopathy-like T-cell lymphoma. *Blood.* 1988 Sep;72(3):1000–6.
44. Smith JL, Hodges E, Quin CT, McCarthy KP, Wright DH. Frequent T and B cell oligoclonal populations in histologically and immunophenotypically characterized angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Am J Pathol.* 2000 Feb;156(2):661–9.
45. Lepretre S, Buchonnet G, Stamatoullas A, Lenain P, Duval C, d’Anjou J, et al. Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000 Feb;117(1):71–9.
46. Nelson M, Horsman DE, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Dave BJ, Loberiza FR, et al. Cytogenetic abnormalities and clinical correlations in peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008 May;141(4):461–9.
47. Huang Y, Moreau A, Dupuis J, Streubel B, Petit B, Le Gouill S, et al. Peripheral T-cell lymphomas with a follicular growth pattern are derived from follicular helper T cells (TFH) and may show overlapping features with angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol.* 2009 May;33(5):682–90.
48. Attygalle AD, Feldman AL, Dogan A. ITK/SYK translocation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2013 Sep;37(9):1456–7.
49. Pechloff K, Holch J, Ferch U, Schweneker M, Brunner K, Kremer M, et al. The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *J Exp Med.* 2010 May 10;207(5):1031–44.
50. Rodríguez M, Alonso-Alonso R, Tomás-Roca L, Rodríguez-Pinilla SM, Manso-Alonso R, Cereceda L, et al. Peripheral T-cell lymphoma: molecular profiling recognizes subclasses and identifies prognostic markers. *Blood Adv.* 2021 Dec 28;5(24):5588–98.
51. Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell.* 2011 Jul 12;20(1):25–38.
52. Couronné L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2012 Jan 5;366(1):95–6.
53. Lemonnier F, Couronné L, Parrens M, Jaïs JP, Travert M, Lamant L, et al. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood.* 2012 Aug 16;120(7):1466–9.
54. Odejide O, Weigert O, Lane AA, Toscano D, Lunning MA, Kopp N, et al. A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 2014 Feb 27;123(9):1293–6.
55. Palomero T, Couronné L, Khiabani H, Kim MY, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet.* 2014 Feb;46(2):166–70.

56. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet.* 2014 Feb;46(2):171–5.
57. Cortes JR, Ambesi-Impiombato A, Couronné L, Quinn SA, Kim CS, da Silva Almeida AC, et al. RHOA G17V Induces T Follicular Helper Cell Specification and Promotes Lymphomagenesis. *Cancer Cell.* 2018 Feb 12;33(2):259-273.e7.
58. Zang S, Li J, Yang H, Zeng H, Han W, Zhang J, et al. Mutations in 5-methylcytosine oxidase TET2 and RhoA cooperatively disrupt T cell homeostasis. *J Clin Invest.* 2017 Aug 1;127(8):2998–3012.
59. Yu DD, Zhang J. Update on recurrent mutations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2021;14(12):1108–18.
60. Jain S, Chen J, Nicolae A, Wang H, Shin DM, Adkins EB, et al. IL-21-driven neoplasms in SJL mice mimic some key features of human angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2015 Nov;185(11):3102–14.
61. Muto H, Sakata-Yanagimoto M, Nagae G, Shiozawa Y, Miyake Y, Yoshida K, et al. Reduced TET2 function leads to T-cell lymphoma with follicular helper T-cell-like features in mice. *Blood Cancer J.* 2014 Dec 12;4(12):e264.
62. Mhaidly R, Krug A, Gaulard P, Lemonnier F, Ricci JE, Verhoeyen E. New preclinical models for angioimmunoblastic T-cell lymphoma: filling the GAP. *Oncogenesis.* 2020 Aug 14;9(8):73.
63. Ng SY, Brown L, Stevenson K, deSouza T, Aster JC, Louissaint A, et al. RhoA G17V is sufficient to induce autoimmunity and promotes T-cell lymphomagenesis in mice. *Blood.* 2018 Aug 30;132(9):935–47.
64. Mondragón L, Mhaidly R, De Donatis GM, Tosolini M, Dao P, Martin AR, et al. GAPDH Overexpression in the T Cell Lineage Promotes Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma through an NF-κB-Dependent Mechanism. *Cancer Cell.* 2019 Sep 16;36(3):268-287.e10.
65. Weisenburger DD, Savage KJ, Harris NL, Gascoyne RD, Jaffe ES, MacLennan KA, et al. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a report of 340 cases from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Blood.* 2011 Mar 24;117(12):3402–8.
66. Rüdiger T, Weisenburger DD, Anderson JR, Armitage JO, Diebold J, MacLennan KA, et al. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2002 Jan;13(1):140–9.
67. Gallamini A, Stelitano C, Calvi R, Bellei M, Mattei D, Vitolo U, et al. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood.* 2004 Apr 1;103(7):2474–9.
68. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Aoki S, Motomura S, Hirano M. Clinico-pathologic features and outcome of Japanese patients with peripheral T-cell lymphomas. *Hematol Oncol.* 2008 Sep;26(3):152–8.
69. Went P, Agostinelli C, Gallamini A, Piccaluga PP, Ascani S, Sabattini E, et al. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006 Jun 1;24(16):2472–9.
70. Van den Bergh M, Alvarez-Argote J, Panwala AH, Dasanu CA. Autoimmune disorders in patients with T-cell lymphoma: a comprehensive review. *Curr Med Res Opin.* 2015;31(10):1861–70.

71. Dupuis J, Emile JF, Mounier N, Gisselbrecht C, Martin-Garcia N, Petrella T, et al. Prognostic significance of Epstein-Barr virus in nodal peripheral T-cell lymphoma, unspecified: A Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) study. *Blood*. 2006 Dec 15;108(13):4163–9.
72. Martínez-Delgado B, Cuadros M, Honrado E, Ruiz de la Parte A, Roncador G, Alves J, et al. Differential expression of NF-kappaB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2254–63.
73. Ballester B, Ramuz O, Gisselbrecht C, Doucet G, Loï L, Loriod B, et al. Gene expression profiling identifies molecular subgroups among nodal peripheral T-cell lymphomas. *Oncogene*. 2006 Mar 9;25(10):1560–70.
74. Piccaluga PP, Agostinelli C, Califano A, Rossi M, Basso K, Zupo S, et al. Gene expression analysis of peripheral T cell lymphoma, unspecified, reveals distinct profiles and new potential therapeutic targets. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):823–34.
75. Iqbal J, Wright G, Wang C, Rosenwald A, Gascoyne RD, Weisenburger DD, et al. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2014 May 8;123(19):2915–23.
76. Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, Vose JM, McKeithan T, Kucuk C, et al. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2010 Feb 4;115(5):1026–36.
77. El-Galaly TC, Pedersen MB, Hutchings M, Mylam KJ, Madsen J, Gang AO, et al. Utility of interim and end-of-treatment PET/CT in peripheral T-cell lymphomas: A review of 124 patients. *Am J Hematol*. 2015 Nov;90(11):975–80.
78. Cottreau AS, Becker S, Broussais F, Casasnovas O, Kanoun S, Roques M, et al. Prognostic value of baseline total metabolic tumor volume (TMTV0) measured on FDG-PET/CT in patients with peripheral T-cell lymphoma (PTCL). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016 Apr;27(4):719–24.
79. Cottreau AS, El-Galaly TC, Becker S, Broussais F, Petersen LJ, Bonnet C, et al. Predictive Value of PET Response Combined with Baseline Metabolic Tumor Volume in Peripheral T-Cell Lymphoma Patients. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2018 Apr;59(4):589–95.
80. Tomita N, Hattori Y, Fujisawa S, Hashimoto C, Taguchi J, Takasaki H, et al. Post-therapy ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for predicting outcome in patients with peripheral T cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2015 Mar;94(3):431–6.
81. Shang Y, Fu X, Chang Y, Li Y, Zhang M. B2 microglobulin is a novel prognostic marker of Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Sci Rep*. 2018 Aug 27;8(1):12907.
82. de Pádua Covas Lage LA, Hamasaki DT, Moreira FR, Rocha V, Zerbini MCN, Pereira J. Absolute monocyte count is a predictor of overall survival and progression-free survival in nodal peripheral T cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2019 Sep;98(9):2097–102.
83. Wilcox RA, Wada DA, Ziesmer SC, ElSawa SF, Comfere NI, Dietz AB, et al. Monocytes promote tumor cell survival in T-cell lymphoproliferative disorders and are impaired in their ability to differentiate into mature dendritic cells. *Blood*. 2009 Oct 1;114(14):2936–44.

84. Ham JS, Park HY, Ryu KJ, Ko YH, Kim WS, Kim SJ. Elevated serum interleukin-10 level and M2 macrophage infiltration are associated with poor survival in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2017 Sep 29;8(44):76231–40.
85. Schlegelberger B, Zwingers T, Hohenadel K, Henne-Bruns D, Schmitz N, Haferlach T, et al. Significance of cytogenetic findings for the clinical outcome in patients with T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1996 Feb;14(2):593–9.
86. de Pádua Covas Lage LA, Culler HF, Barreto GC, Reichert CO, Levy D, de Oliveira Costa R, et al. Tumor mutation burden involving epigenetic regulatory genes and the RhoA GTPase predicts overall survival in nodal mature T-cell lymphomas. *Clin Epigenetics*. 2022 Dec 19;14(1):180.
87. Wei C, Li W, Qin L, Liu S, Xue C, Ren K, et al. Clinicopathologic characteristics, outcomes, and prognostic factors of angioimmunoblastic T-cell lymphoma in China. *Cancer Med*. 2023 Feb;12(4):3987–98.
88. Asano N, Suzuki R, Kagami Y, Ishida F, Kitamura K, Fukutani H, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of cytotoxic molecule expression in nodal peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am J Surg Pathol*. 2005 Oct;29(10):1284–93.
89. Rodríguez-Antona C, Leskelä S, Zajac M, Cuadros M, Alvéz J, Moneo MV, et al. Expression of CYP3A4 as a predictor of response to chemotherapy in peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3345–51.
90. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993 Sep 30;329(14):987–94.
91. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997 Jun 1;89(11):3909–18.
92. Ellin F, Landström J, Jerkeman M, Relander T. Real-world data on prognostic factors and treatment in peripheral T-cell lymphomas: a study from the Swedish Lymphoma Registry. *Blood*. 2014 Sep 4;124(10):1570–7.
93. Sibon D. Peripheral T-Cell Lymphomas: Therapeutic Approaches. *Cancers*. 2022 May 8;14(9):2332.
94. Reimer P, Rüdiger T, Geissinger E, Weissinger F, Nerl C, Schmitz N, et al. Autologous stem-cell transplantation as first-line therapy in peripheral T-cell lymphomas: results of a prospective multicenter study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Jan 1;27(1):106–13.
95. Fossard G, Broussais F, Coelho I, Bailly S, Nicolas-Virelizier E, Toussaint E, et al. Role of up-front autologous stem-cell transplantation in peripheral T-cell lymphoma for patients in response after induction: an analysis of patients from LYSA centers. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018 Mar 1;29(3):715–23.
96. Park SI, Horwitz SM, Foss FM, Pinter-Brown LC, Carson KR, Rosen ST, et al. The role of autologous stem cell transplantation in patients with nodal peripheral T-cell lymphomas in first complete remission: Report from COMPLETE, a prospective, multicenter cohort study. *Cancer*. 2019 May 1;125(9):1507–17.
97. Schmitz N, Truemper L, Bouabdallah K, Ziepert M, Leclerc M, Cartron G, et al. A randomized phase 3 trial of autologous vs allogeneic transplantation as part of first-line therapy in poor-risk peripheral T-NHL. *Blood*. 2021 May 13;137(19):2646–56.

98. Mak V, Hamm J, Chhanabhai M, Shenkier T, Klasa R, Sehn LH, et al. Survival of patients with peripheral T-cell lymphoma after first relapse or progression: spectrum of disease and rare long-term survivors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Jun 1;31(16):1970–6.
99. Chen AI, McMillan A, Negrin RS, Horning SJ, Laport GG. Long-term results of autologous hematopoietic cell transplantation for peripheral T cell lymphoma: the Stanford experience. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2008 Jul;14(7):741–7.
100. Kyriakou C, Canals C, Goldstone A, Caballero D, Metzner B, Kobbe G, et al. High-dose therapy and autologous stem-cell transplantation in angioimmunoblastic lymphoma: complete remission at transplantation is the major determinant of Outcome-Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Jan 10;26(2):218–24.
101. Corradini P, Dodero A, Zallio F, Caracciolo D, Casini M, Bregni M, et al. Graft-versus-lymphoma effect in relapsed peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas after reduced-intensity conditioning followed by allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 Jun 1;22(11):2172–6.
102. Le Gouill S, Milpied N, Buzyn A, De Latour RP, Vernant JP, Mohty M, et al. Graft-versus-lymphoma effect for aggressive T-cell lymphomas in adults: a study by the Société Française de Greffe de Moëlle et de Thérapie Cellulaire. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 May 10;26(14):2264–71.
103. Dodero A, Spina F, Narni F, Patriarca F, Cavattoni I, Benedetti F, et al. Allogeneic transplantation following a reduced-intensity conditioning regimen in relapsed/refractory peripheral T-cell lymphomas: long-term remissions and response to donor lymphocyte infusions support the role of a graft-versus-lymphoma effect. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):520–6.
104. Du J, Jin S, Zhang M, Fu X, Yang J, Zhang L, et al. Precise diagnosis and targeted therapy of nodal T-follicular helper cell lymphoma (T-FHCL). *Front Oncol*. 2023;13:1163190.
105. Coiffier B, Pro B, Prince HM, Foss F, Sokol L, Greenwood M, et al. Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Feb 20;30(6):631–6.
106. O'Connor OA, Horwitz S, Masszi T, Van Hoof A, Brown P, Doorduijn J, et al. Belinostat in Patients With Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma: Results of the Pivotal Phase II BELIEF (CLN-19) Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Aug 10;33(23):2492–9.
107. Bachy E, Camus V, Thieblemont C, Sibon D, Casasnovas RO, Ysebaert L, et al. Romidepsin Plus CHOP Versus CHOP in Patients With Previously Untreated Peripheral T-Cell Lymphoma: Results of the Ro-CHOP Phase III Study (Conducted by LYSA). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2022 Jan 20;40(3):242–51.
108. Cheminant M, Bruneau J, Kosmider O, Lefrere F, Delarue R, Gaulard P, et al. Efficacy of 5-azacytidine in a TET2 mutated angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2015 Mar;168(6):913–6.
109. Lemonnier F, Dupuis J, Sujobert P, Tournilhac O, Cheminant M, Sarkozy C, et al. Treatment with 5-azacytidine induces a sustained response in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2018 Nov 22;132(21):2305–9.
110. Maruyama D, Tobinai K, Makita S, Ishida T, Kusumoto S, Ishitsuka K, et al. First-in-Human Study of the EZH1/2 Dual Inhibitor DS-3201b in Patients with Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphomas — Preliminary Results. *Blood*. 2017 Dec 8;130:4070.

111. Pro B, Brammer JE, Casulo C, Jacobsen E, Mead M, Mehta-Shah N, et al. Duvelisib in Patients with Relapsed/Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma from the Phase 2 Primo Trial: Dose Optimization Efficacy Update and Expansion Phase Initial Results. *Blood*. 2020 Nov 5;136:38–9.
112. Huen A, Haverkos BM, Zain J, Radhakrishnan R, Lechowicz MJ, Devata S, et al. Phase I/Ib Study of Tenalisib (RP6530), a Dual PI3K δ/γ Inhibitor in Patients with Relapsed/Refractory T-Cell Lymphoma. *Cancers*. 2020 Aug 15;12(8):2293.
113. Dreyling M, Morschhauser F, Bouabdallah K, Bron D, Cunningham D, Assouline SE, et al. Phase II study of copanlisib, a PI3K inhibitor, in relapsed or refractory, indolent or aggressive lymphoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 Sep 1;28(9):2169–78.
114. Yhim HY, Kim T, Kim SJ, Shin HJ, Koh Y, Kim JS, et al. Combination treatment of copanlisib and gemcitabine in relapsed/refractory PTCL (COSMOS): an open-label phase I/II trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2021 Apr;32(4):552–9.
115. Kim SJ, Shin DY, Kim JS, Yoon DH, Lee WS, Lee H, et al. A phase II study of everolimus (RAD001), an mTOR inhibitor plus CHOP for newly diagnosed peripheral T-cell lymphomas. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016 Apr;27(4):712–8.
116. Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):7159–63.
117. Murphy JB, Morton JJ. The Lymphocyte as a Factor in Natural and Induced Resistance to Transplanted Cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1915 Jul;1(7):435–7.
118. Yarchoan R, Uldrick TS. HIV-Associated Cancers and Related Diseases. *N Engl J Med*. 2018 Mar 15;378(11):1029–41.
119. Demaria O, Cornen S, Daëron M, Morel Y, Medzhitov R, Vivier E. Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature*. 2019 Oct;574(7776):45–56.
120. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2019 Jun;19(6):369–82.
121. Mantovani A, Allavena P, Marchesi F, Garlanda C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Nov;21(11):799–820.
122. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci*. 2014 Jan;105(1):1–8.
123. Broz ML, Binnewies M, Boldajipour B, Nelson AE, Pollack JL, Erle DJ, et al. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell*. 2014 Dec 8;26(6):938.
124. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002 Nov;23(11):549–55.
125. Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F, et al. Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Front Immunol*. 2017;8:1097.

126. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. 2017 May 25;545(7655):495–9.
127. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CMT, Pryer N, et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*. 2014 Nov 10;26(5):623–37.
128. Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, et al. TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*. 2018 Feb 22;554(7693):544–8.
129. Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, Basso C, Feng Y, Fuhrer T, et al. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell*. 2016 Oct 20;167(3):829–842.e13.
130. Casanova-Acebes M, Dalla E, Leader AM, LeBerichel J, Nikolic J, Morales BM, et al. Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells. *Nature*. 2021 Jul;595(7868):578–84.
131. Nywening TM, Wang-Gillam A, Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Cusworth BM, et al. Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016 May;17(5):651–62.
132. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011 Jun 8;475(7355):222–5.
133. Lim SY, Yuzhalin AE, Gordon-Weeks AN, Muschel RJ. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*. 2016 May 10;7(19):28697–710.
134. Connolly KA, Belt BA, Figueroa NM, Murthy A, Patel A, Kim M, et al. Increasing the efficacy of radiotherapy by modulating the CCR2/CCR5 chemokine axes. *Oncotarget*. 2016 Dec 27;7(52):86522–35.
135. Fridlender ZG, Buchlis G, Kapoor V, Cheng G, Sun J, Singhal S, et al. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2010 Jan 1;70(1):109–18.
136. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1264–72.
137. Papadopoulos KP, Gluck L, Martin LP, Olszanski AJ, Tolcher AW, Ngarmchamnanrith G, et al. First-in-Human Study of AMG 820, a Monoclonal Anti-Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Antibody, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Oct 1;23(19):5703–10.
138. Xu J, Escamilla J, Mok S, David J, Priceman S, West B, et al. CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res*. 2013 May 1;73(9):2782–94.
139. Wang Q, Lu Y, Li R, Jiang Y, Zheng Y, Qian J, et al. Therapeutic effects of CSF1R-blocking antibodies in multiple myeloma. *Leukemia*. 2018 Jan;32(1):176–83.
140. Peranzoni E, Lemoine J, Vimeux L, Feuillet V, Barrin S, Kantari-Mimoun C, et al. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Apr 24;115(17):E4041–50.

141. Kr W, Nm G, Dh Y, Aa S, Sr C, Is G, et al. Combination of CD40 Agonism and CSF-1R Blockade Reconditions Tumor-Associated Macrophages and Drives Potent Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2017 Dec [cited 2023 Sep 19];5(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29097420/>
142. Gomez-Roca CA, Italiano A, Le Tourneau C, Cassier PA, Toulmonde M, D'Angelo SP, et al. Phase I study of emactuzumab single agent or in combination with paclitaxel in patients with advanced/metastatic solid tumors reveals depletion of immunosuppressive M2-like macrophages. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019 Aug 1;30(8):1381–92.
143. Vonderheide RH. The Immune Revolution: A Case for Priming, Not Checkpoint. *Cancer Cell*. 2018 Apr 9;33(4):563–9.
144. Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, Saboury B, Teitelbaum UR, Sun W, et al. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1612–6.
145. Byrne KT, Vonderheide RH. CD40 Stimulation Obviates Innate Sensors and Drives T Cell Immunity in Cancer. *Cell Rep*. 2016 Jun 21;15(12):2719–32.
146. Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer ARL, Bajor DL, et al. Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2015 Apr;3(4):399–411.
147. Pettenati C, Ingersoll MA. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2018 Oct;15(10):615–25.
148. Guerriero JL, Sotayo A, Ponichtera HE, Castrillon JA, Pourzia AL, Schad S, et al. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. *Nature*. 2017 Mar 16;543(7645):428–32.
149. Sai J, Owens P, Novitskiy SV, Hawkins OE, Vilgelm AE, Yang J, et al. PI3K Inhibition Reduces Mammary Tumor Growth and Facilitates Antitumor Immunity and Anti-PD1 Responses. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Jul 1;23(13):3371–84.
150. De Henau O, Rausch M, Winkler D, Campesato LF, Liu C, Cymerman DH, et al. Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K γ in myeloid cells. *Nature*. 2016 Nov 17;539(7629):443–7.
151. Kaneda MM, Cappello P, Nguyen AV, Ralainirina N, Hardamon CR, Foubert P, et al. Macrophage PI3K γ Drives Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression. *Cancer Discov*. 2016 Aug;6(8):870–85.
152. Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem CJ, Gorjestani S, et al. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature*. 2016 Nov 17;539(7629):437–42.
153. Strauss L, Mahmoud MAA, Weaver JD, Tijaro-Ovalle NM, Christofides A, Wang Q, et al. Targeted deletion of PD-1 in myeloid cells induces antitumor immunity. *Sci Immunol*. 2020 Jan 3;5(43):eaay1863.
154. Zhang F, Parayath NN, Ene CI, Stephan SB, Koehne AL, Coon ME, et al. Genetic programming of macrophages to perform anti-tumor functions using targeted mRNA nanocarriers. *Nat Commun*. 2019 Sep 3;10(1):3974.

155. Curtale G, Rubino M, Locati M. MicroRNAs as Molecular Switches in Macrophage Activation. *Front Immunol.* 2019;10:799.
156. Zang X, Zhang X, Zhao X, Hu H, Qiao M, Deng Y, et al. Targeted Delivery of miRNA 155 to Tumor Associated Macrophages for Tumor Immunotherapy. *Mol Pharm.* 2019 Apr 1;16(4):1714–22.
157. Peterson TE, Kirkpatrick ND, Huang Y, Farrar CT, Marijt KA, Kloepper J, et al. Dual inhibition of Ang-2 and VEGF receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Apr 19;113(16):4470–5.
158. Kloepper J, Riedemann L, Amoozgar Z, Seano G, Susek K, Yu V, et al. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Apr 19;113(16):4476–81.
159. Rodriguez-Garcia A, Lynn RC, Poussin M, Eiva MA, Shaw LC, O'Connor RS, et al. CAR-T cell-mediated depletion of immunosuppressive tumor-associated macrophages promotes endogenous antitumor immunity and augments adoptive immunotherapy. *Nat Commun.* 2021 Feb 9;12(1):877.
160. Sloas C, Gill S, Klichinsky M. Engineered CAR-Macrophages as Adoptive Immunotherapies for Solid Tumors. *Front Immunol.* 2021;12:783305.
161. Hegde S, Krishawan VE, Herzog BH, Zuo C, Breden MA, Knolhoff BL, et al. Dendritic Cell Paucity Leads to Dysfunctional Immune Surveillance in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell.* 2020 Mar 16;37(3):289-307.e9.
162. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004 Oct;4(10):762–74.
163. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, Leboeuf M, Remark R, Jordan S, et al. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity.* 2016 Apr 19;44(4):924–38.
164. Spranger S, Dai D, Horton B, Gajewski TF. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell.* 2017 May 8;31(5):711-723.e4.
165. Sánchez-Paulete AR, Cueto FJ, Martínez-López M, Labiano S, Morales-Kastresana A, Rodríguez-Ruiz ME, et al. Cancer Immunotherapy with Immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 Monoclonal Antibodies Requires BATF3-Dependent Dendritic Cells. *Cancer Discov.* 2016 Jan;6(1):71–9.
166. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Brees H, Cabeza-Cabrero M, Sammicheli S, et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell.* 2018 Feb 22;172(5):1022-1037.e14.
167. Barry KC, Hsu J, Broz ML, Cueto FJ, Binnewies M, Combes AJ, et al. A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat Med.* 2018 Aug;24(8):1178–91.
168. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol.* 2004 Dec;5(12):1219–26.
169. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 Aug;15(8):471–85.

170. Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, Gobert M, Treilleux I, Bajard A, et al. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2011 Aug 15;71(16):5423–34.
171. Aspod C, Leccia MT, Charles J, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells support melanoma progression by promoting Th2 and regulatory immunity through OX40L and ICOSL. *Cancer Immunol Res.* 2013 Dec;1(6):402–15.
172. Chow KV, Sutherland RM, Zhan Y, Lew AM. Heterogeneity, functional specialization and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 2017 Mar;95(3):244–51.
173. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol.* 2017 Jun;17(6):349–62.
174. Schettters STT, Rodriguez E, Kruijssen LJW, Crommentuijn MHW, Boon L, Van den Bossche J, et al. Monocyte-derived APCs are central to the response of PD1 checkpoint blockade and provide a therapeutic target for combination therapy. *J Immunother Cancer.* 2020 Jul;8(2):e000588.
175. Ferrucci PF, Pala L, Conforti F, Cocorocchio E. Talimogene Laherparepvec (T-VEC): An Intralesional Cancer Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Cancers.* 2021 Mar 18;13(6):1383.
176. Saito T, Takayama T, Osaki T, Nagai S, Suzuki T, Sato M, et al. Combined mobilization and stimulation of tumor-infiltrating dendritic cells and natural killer cells with Flt3 ligand and IL-18 in vivo induces systemic antitumor immunity. *Cancer Sci.* 2008 Oct;99(10):2028–36.
177. Jiang L, Liu G, Ni W, Zhang N, Jie J, Xie F, et al. The Combination of MBP and BCG-Induced Dendritic Cell Maturation through TLR2/TLR4 Promotes Th1 Activation In Vitro and Vivo. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1953680.
178. Martins KAO, Bavari S, Salazar AM. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert Rev Vaccines.* 2015 Mar;14(3):447–59.
179. Drobits B, Holcmann M, Amberg N, Swiecki M, Grundtner R, Hammer M, et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest.* 2012 Feb;122(2):575–85.
180. Galati D, Zanotta S. Hematologic neoplasms: Dendritic cells vaccines in motion. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2017 Oct;183:181–90.
181. Pitt JM, André F, Amigorena S, Soria JC, Eggermont A, Kroemer G, et al. Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1224–32.
182. Reap EA, Suryadevara CM, Batich KA, Sanchez-Perez L, Archer GE, Schmittling RJ, et al. Dendritic Cells Enhance Polyfunctionality of Adoptively Transferred T Cells That Target Cytomegalovirus in Glioblastoma. *Cancer Res.* 2018 Jan 1;78(1):256–64.
183. Khoury HJ, Collins RH, Blum W, Stiff PS, Elias L, Lebkowski JS, et al. Immune responses and long-term disease recurrence status after telomerase-based dendritic cell immunotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2017 Aug 15;123(16):3061–72.
184. Anguille S, Van de Velde AL, Smits EL, Van Tendeloo VF, Juliusson G, Cools N, et al. Dendritic cell vaccination as postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017 Oct 12;130(15):1713–21.

185. Lowenfeld L, Mick R, Datta J, Xu S, Fitzpatrick E, Fisher CS, et al. Dendritic Cell Vaccination Enhances Immune Responses and Induces Regression of HER2pos DCIS Independent of Route: Results of Randomized Selection Design Trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017 Jun 15;23(12):2961–71.
186. Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, van Baren N, Lucas S, Kvistborg P, et al. Phase II Study of Autologous Monocyte-Derived mRNA Electroporated Dendritic Cells (TriMixDC-MEL) Plus Ipilimumab in Patients With Pretreated Advanced Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2016 Apr 20;34(12):1330–8.
187. Caballero-Baños M, Benitez-Ribas D, Tabera J, Varea S, Vilana R, Bianchi L, et al. Phase II randomised trial of autologous tumour lysate dendritic cell plus best supportive care compared with best supportive care in pre-treated advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2016 Sep;64:167–74.
188. Björklund AT, Carlsten M, Sohlberg E, Liu LL, Clancy T, Karimi M, et al. Complete Remission with Reduction of High-Risk Clones following Haploidentical NK-Cell Therapy against MDS and AML. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2018 Apr 15;24(8):1834–44.
189. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity.* 2017 Nov 21;47(5):820–33.
190. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol.* 2018;9:1869.
191. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* 2000 Sep 4;192(5):755–60.
192. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med.* 2001 Jan;7(1):94–100.
193. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med.* 2002 Jan 21;195(2):161–9.
194. Street SEA, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, et al. Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. *J Exp Med.* 2004 Mar 15;199(6):879–84.
195. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):571–80.
196. Lorenzi L, Tabellini G, Vermi W, Moratto D, Porta F, Notarangelo LD, et al. Occurrence of nodular lymphocyte-predominant hodgkin lymphoma in hermannsky-pudlak type 2 syndrome is associated to natural killer and natural killer T cell defects. *PLoS One.* 2013;8(11):e80131.
197. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, Shaw PA, Zerbe CS, Calvo KR, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood.* 2014 Feb 6;123(6):809–21.
198. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep;132(3):515–25.
199. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005 Feb;42(4):501–10.

200. Roda JM, Parihar R, Magro C, Nuovo GJ, Tridandapani S, Carson WE. Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):517–26.
201. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol.* 2003 Nov;24(11):603–9.
202. Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight.* 2016 Oct 20;1(17):e89829.
203. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 1999 Jul 1;94(1):333–9.
204. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002 Mar 15;295(5562):2097–100.
205. Geller MA, Knorr DA, Hermanson DA, Pribyl L, Bendzick L, McCullar V, et al. Intraperitoneal delivery of human natural killer cells for treatment of ovarian cancer in a mouse xenograft model. *Cytotherapy.* 2013 Oct;15(10):1297–306.
206. Shi J, Tricot G, Szmania S, Rosen N, Garg TK, Malaviarachchi PA, et al. Infusion of haplo-identical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2008 Dec;143(5):641–53.
207. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood.* 2005 Apr 15;105(8):3051–7.
208. Bachanova V, Burns LJ, McKenna DH, Curtsinger J, Panoskaltsis-Mortari A, Lindgren BR, et al. Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunol Immunother Cll.* 2010 Nov;59(11):1739–44.
209. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med.* 2020 Feb 6;382(6):545–53.
210. Felices M, Lenvik TR, Davis ZB, Miller JS, Vallera DA. Generation of BiKEs and TriKEs to Improve NK Cell-Mediated Targeting of Tumor Cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2016;1441:333–46.
211. Vallera DA, Felices M, McElmurry R, McCullar V, Zhou X, Schmohl JU, et al. IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2016 Jul 15;22(14):3440–50.
212. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell.* 2018 Dec 13;175(7):1731-1743.e13.
213. Rosario M, Liu B, Kong L, Collins LI, Schneider SE, Chen X, et al. The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances FcγRIIIa-Triggered NK Cell Responses and In Vivo Clearance of B Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2016 Feb 1;22(3):596–608.

214. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Apr 1;131(4):959–71.
215. Nielsen JS, Nelson BH. Tumor-infiltrating B cells and T cells: Working together to promote patient survival. *Oncoimmunology*. 2012 Dec 1;1(9):1623–5.
216. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Preffer FI, Bhan AK. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int Immunol*. 2000 May;12(5):597–605.
217. Ritchie DS, Yang J, Hermans IF, Ronchese F. B-Lymphocytes activated by CD40 ligand induce an antigen-specific anti-tumour immune response by direct and indirect activation of CD8(+) T-cells. *Scand J Immunol*. 2004 Dec;60(6):543–51.
218. Ahmadi T, Flies A, Efebera Y, Sherr DH. CD40 Ligand-activated, antigen-specific B cells are comparable to mature dendritic cells in presenting protein antigens and major histocompatibility complex class I- and class II-binding peptides. *Immunology*. 2008 May;124(1):129–40.
219. Germain C, Gnjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 1;189(7):832–44.
220. Shi JY, Gao Q, Wang ZC, Zhou J, Wang XY, Min ZH, et al. Margin-infiltrating CD20(+) B cells display an atypical memory phenotype and correlate with favorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013 Nov 1;19(21):5994–6005.
221. Qin Z, Richter G, Schüler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med*. 1998 May;4(5):627–30.
222. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015 Apr 21;42(4):607–12.
223. Shalpour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*. 2015 May 7;521(7550):94–8.
224. Watt V, Ronchese F, Ritchie D. Resting B cells suppress tumor immunity via an MHC class-II dependent mechanism. *J Immunother Hagerstown Md 1997*. 2007 Apr;30(3):323–32.
225. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer*. 2021 Jan;124(2):359–67.
226. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591–619.
227. Yang YR, Choi JH, Chang JS, Kwon HM, Jang HJ, Ryu SH, et al. Diverse cellular and physiological roles of phospholipase C- γ 1. *Adv Biol Regul*. 2012 Jan;52(1):138–51.
228. Philip M, Schietinger A. CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2022 Apr;22(4):209–23.
229. Speiser DE, Chijioke O, Schaeuble K, Münz C. CD4+ T cells in cancer. *Nat Cancer*. 2023 Mar;4(3):317–29.
230. Zanetti M. Tapping CD4 T cells for cancer immunotherapy: the choice of personalized genomics. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Mar 1;194(5):2049–56.

231. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655–69.
232. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1557–69.
233. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res*. 2010 Nov 1;70(21):8368–77.
234. Barnes TA, Amir E. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *Br J Cancer*. 2018 Jan;118(2):e5.
235. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.
236. Li K, Donaldson B, Young V, Ward V, Jackson C, Baird M, et al. Adoptive cell therapy with CD4+ T helper 1 cells and CD8+ cytotoxic T cells enhances complete rejection of an established tumour, leading to generation of endogenous memory responses to non-targeted tumour epitopes. *Clin Transl Immunol*. 2017 Oct;6(10):e160.
237. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997 May 16;89(4):587–96.
238. Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem*. 1997 Aug 22;272(34):21597–603.
239. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010 Apr;10(4):225–35.
240. Lazarski CA, Ford J, Katzman SD, Rosenberg AF, Fowell DJ. IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance. *PloS One*. 2013;8(8):e71949.
241. De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2011 Mar 14;208(3):469–78.
242. Kitajima M, Ito T, Tumes DJ, Endo Y, Onodera A, Hashimoto K, et al. Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells. *Cancer Res*. 2011 Jul 15;71(14):4790–8.
243. Kusuda T, Shigemasa K, Arihiro K, Fujii T, Nagai N, Ohama K. Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2005 Jun;13(6):1153–8.
244. Boieri M, Malishkevich A, Guennoun R, Marchese E, Kroon S, Trerice KE, et al. CD4+ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation. *J Exp Med*. 2022 Jul 4;219(7):e20201963.
245. Yoon NK, Maresh EL, Shen D, Elshimali Y, Apple S, Horvath S, et al. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum Pathol*. 2010 Dec;41(12):1794–801.

246. Schreck S, Friebel D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young LS, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*. 2009 Mar;27(1):31–9.
247. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*. 2010 Jun;11(6):527–34.
248. Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med*. 2012 Aug;18(8):1248–53.
249. Lu Y, Wang Q, Xue G, Bi E, Ma X, Wang A, et al. Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell*. 2018 Jun 11;33(6):1048-1060.e7.
250. Végran F, Apetoh L, Ghiringhelli F. Th9 cells: a novel CD4 T-cell subset in the immune war against cancer. *Cancer Res*. 2015 Feb 1;75(3):475–9.
251. Xue G, Zheng N, Fang J, Jin G, Li X, Dotti G, et al. Adoptive cell therapy with tumor-specific Th9 cells induces viral mimicry to eliminate antigen-loss-variant tumor cells. *Cancer Cell*. 2021 Dec 13;39(12):1610-1622.e9.
252. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121–33.
253. Mangan PR, Harrington LE, O’Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):231–4.
254. Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, et al. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):958–66.
255. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 2008 Jan;28(1):29–39.
256. Brucklacher-Waldert V, Ferreira C, Stebegg M, Fesneau O, Innocentin S, Marie JC, et al. Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- β -Independent T Helper-17 Differentiation. *Cell Rep*. 2017 Jun 13;19(11):2357–70.
257. Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nat Rev Immunol*. 2023 Jan;23(1):38–54.
258. Brockmann L, Giannou AD, Gagliani N, Huber S. Regulation of TH17 Cells and Associated Cytokines in Wound Healing, Tissue Regeneration, and Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017 May 11;18(5):1033.
259. Li J, Lau GKK, Chen L, Dong S sui, Lan HY, Huang XR, et al. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF- κ B induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *PLoS One*. 2011;6(7):e21816.
260. Fabre JAS, Giustinniani J, Garbar C, Merrouche Y, Antonicelli F, Bensussan A. The Interleukin-17 Family of Cytokines in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 4;19(12):3880.

261. Al Omar S, Flanagan BF, Almeahmadi M, Christmas SE. The effects of IL-17 upon human natural killer cells. *Cytokine*. 2013 Apr;62(1):123–30.
262. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*. 2009 Jul 9;114(2):357–9.
263. Pan B, Shen J, Cao J, Zhou Y, Shang L, Jin S, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Sci Rep*. 2015 Nov 3;5:16053.
264. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol*. 2009 May;50(5):980–9.
265. Lv L, Pan K, Li X dong, She K lin, Zhao J jing, Wang W, et al. The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PloS One*. 2011 Mar 31;6(3):e18219.
266. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, et al. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Jun 1;14(11):3254–61.
267. Gao X, Wang H, Chen Z, Zhou P, Yu D. An optimized method to differentiate mouse follicular helper T cells in vitro. *Cell Mol Immunol*. 2020 Jul;17(7):779–81.
268. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*. 2009 Aug 21;325(5943):1006–10.
269. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 2000 Dec 4;192(11):1545–52.
270. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*. 2000 Dec 4;192(11):1553–62.
271. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*. 2019 May 21;50(5):1132–48.
272. Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, et al. The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Aug 15;175(4):2340–8.
273. Niogret J, Berger H, Rebe C, Mary R, Ballot E, Truntzer C, et al. Follicular helper-T cells restore CD8+ dependent antitumor immunity and anti-PD-L1/PD-1 efficacy. *J Immunother Cancer*. 2021 Jun;9(6):e002157.
274. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature*. 2020 Jan;577(7791):549–55.
275. Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TWW, Sun CM, Calderaro J, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*. 2020 Jan;577(7791):556–60.

276. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup Larsen M, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020 Jan;577(7791):561–5.
277. Hollern DP, Xu N, Thennavan A, Glodowski C, Garcia-Recio S, Mott KR, et al. B Cells and T Follicular Helper Cells Mediate Response to Checkpoint Inhibitors in High Mutation Burden Mouse Models of Breast Cancer. *Cell*. 2019 Nov 14;179(5):1191-1206.e21.
278. Overacre-Delgoffe AE, Bumgarner HJ, Cillo AR, Burr AHP, Tometich JT, Bhattacharjee A, et al. Microbiota-specific T follicular helper cells drive tertiary lymphoid structures and anti-tumor immunity against colorectal cancer. *Immunity*. 2021 Dec 14;54(12):2812-2824.e4.
279. Cillo AR, Kürten CHL, Tabib T, Qi Z, Onkar S, Wang T, et al. Immune Landscape of Viral- and Carcinogen-Driven Head and Neck Cancer. *Immunity*. 2020 Jan 14;52(1):183-199.e9.
280. Tay RE, Richardson EK, Toh HC. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer Gene Ther*. 2021 Feb;28(1–2):5–17.
281. Takeuchi A, Badr MESG, Miyauchi K, Ishihara C, Onishi R, Guo Z, et al. CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J Exp Med*. 2016 Jan 11;213(1):123–38.
282. Hirschhorn-Cymerman D, Budhu S, Kitano S, Liu C, Zhao F, Zhong H, et al. Induction of tumoricidal function in CD4+ T cells is associated with concomitant memory and terminally differentiated phenotype. *J Exp Med*. 2012 Oct 22;209(11):2113–26.
283. Stéphan P, Lautreite R, Voisin A, Grinberg-Bleyer Y. Transcriptional Control of Regulatory T Cells in Cancer: Toward Therapeutic Targeting? *Cancers*. 2020 Oct 30;12(11):3194.
284. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330–6.
285. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):68–73.
286. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):20–1.
287. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(12):R75-81.
288. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 May 1;172(9):5213–21.
289. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875–86.
290. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007 Mar;26(3):371–81.

291. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):523–32.
292. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009 Jun 19;30(6):899–911.
293. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 15;12(4):298–306.
294. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006 Apr;6(4):295–307.
295. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Nov 15;163(10):5211–8.
296. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999 Jul 1;59(13):3128–33.
297. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, et al. Two FOXP3⁺CD4⁺ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*. 2016 Jun;22(6):679–84.
298. Rech AJ, Mick R, Martin S, Recio A, Aqui NA, Powell DJ, et al. CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory T cells in concert with immunotherapy in cancer patients. *Sci Transl Med*. 2012 May 16;4(134):134ra62.
299. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med*. 2013 Aug 26;210(9):1695–710.
300. Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Vence L, Wargo J, Allison JP, et al. Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3⁺ Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers-Response. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2019 Jun 1;25(11):3469–70.
301. Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C, Ballabeni P, et al. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 May 12;112(19):6140–5.
302. Quezada SA, Peggs KS. Lost in Translation: Deciphering the Mechanism of Action of Anti-human CTLA-4. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2019 Feb 15;25(4):1130–2.
303. Nicholson SM, Carlesso G, Cheng LI, Cook H, DaCosta K, Leininger J, et al. Effects of ICOS⁺ T cell depletion via afucosylated monoclonal antibody MEDI-570 on pregnant cynomolgus monkeys and the developing offspring. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2017 Dec;74:116–33.
304. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*. 2011 Jul 13;475(7355):226–30.
305. Kurose K, Ohue Y, Wada H, Iida S, Ishida T, Kojima T, et al. Phase Ia Study of FoxP3⁺ CD4 Treg Depletion by Infusion of a Humanized Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, in Cancer Patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Oct 1;21(19):4327–36.

306. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 29;110(44):17945–50.
307. Maj T, Wang W, Crespo J, Zhang H, Wang W, Wei S, et al. Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nat Immunol*. 2017 Dec;18(12):1332–41.
308. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:337–65.
309. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, et al. Defining ‘T cell exhaustion’. *Nat Rev Immunol*. 2019 Nov;19(11):665–74.
310. Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):393–405.
311. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999 Oct 14;401(6754):708–12.
312. Masopust D, Choo D, Vezys V, Wherry EJ, Duraiswamy J, Akondy R, et al. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med*. 2010 Mar 15;207(3):553–64.
313. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol*. 2009 May;10(5):524–30.
314. Chen Y, Zander R, Khatun A, Schauder DM, Cui W. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation. *Front Immunol*. 2018;9:2826.
315. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:175–208.
316. Ahmed R, Salmi A, Butler LD, Chiller JM, Oldstone MB. Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J Exp Med*. 1984 Aug 1;160(2):521–40.
317. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2205–13.
318. Kostense S, Ogg GS, Manting EH, Gillespie G, Joling J, Vandenberghe K, et al. High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *Eur J Immunol*. 2001 Mar;31(3):677–86.
319. Shankar P, Russo M, Harnisch B, Patterson M, Skolnik P, Lieberman J. Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):3094–101.
320. Schlaak JF, Tully G, Löhr HF, Gerken G, Meyer zum Büschenfelde KH. The presence of high amounts of HBV-DNA in serum is associated with suppressed costimulatory effects of interleukin 12 on HBV-induced immune response. *J Hepatol*. 1999 Mar;30(3):353–8.

321. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, et al. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol.* 2001 Jun;75(12):5550–8.
322. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol.* 2003 Apr;77(8):4911–27.
323. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006 Feb 9;439(7077):682–7.
324. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006 Sep 21;443(7109):350–4.
325. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med.* 2006 Oct 2;203(10):2281–92.
326. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, et al. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol.* 2007 Mar;81(6):2545–53.
327. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol.* 2006 Nov;80(22):11398–403.
328. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med.* 2010 Sep 27;207(10):2175–86.
329. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell.* 2018 Apr 9;33(4):547–62.
330. Dillman RO. Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 2011 Feb;26(1):1–64.
331. Waldmann TA. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Dec 3;10(12):a028472.
332. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature.* 1987 Jul 16;328(6127):267–70.
333. Dariavach P, Mattéi MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol.* 1988 Dec;18(12):1901–5.
334. Lafage-Pochitaloff M, Costello R, Couez D, Simonetti J, Mannoni P, Mawas C, et al. Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34. *Immunogenetics.* 1990;31(3):198–201.
335. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med.* 1991 Sep 1;174(3):561–9.
336. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattry R, Hong DK, Zhang W, et al. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science.* 1998 Dec 18;282(5397):2263–6.

337. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):405–13.
338. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995 Nov;3(5):541–7.
339. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):985–8.
340. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun*. 2000 Feb;1(3):170–84.
341. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):303–10.
342. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008 Oct 10;322(5899):271–5.
343. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011 Apr 29;332(6029):600–3.
344. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996 Mar 22;271(5256):1734–6.
345. van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med*. 1999 Aug 2;190(3):355–66.
346. Hurwitz AA, Yu TF, Leach DR, Allison JP. CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 18;95(17):10067–71.
347. Mokyr MB, Kalinichenko T, Gorelik L, Bluestone JA. Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice. *Cancer Res*. 1998 Dec 1;58(23):5301–4.
348. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 15;100(8):4712–7.
349. Small EJ, Tchekmedyian NS, Rini BI, Fong L, Lowy I, Allison JP. A pilot trial of CTLA-4 blockade with human anti-CTLA-4 in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007 Mar 15;13(6):1810–5.
350. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2517–26.
351. Ansell SM, Hurvitz SA, Koenig PA, LaPlant BR, Kabat BF, Fernando D, et al. Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Oct 15;15(20):6446–53.

352. Davids MS, Kim HT, Bachireddy P, Costello C, Liguori R, Savell A, et al. Ipilimumab for Patients with Relapse after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med*. 2016 Jul 14;375(2):143–53.
353. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):3887–95.
354. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996 May;8(5):765–72.
355. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018 Mar;18(3):153–67.
356. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1365–9.
357. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):261–8.
358. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Nov 15;169(10):5538–45.
359. Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol*. 1998 Oct;10(10):1563–72.
360. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010 Jul;236:219–42.
361. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 17;99(19):12293–7.
362. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res*. 2005 Feb 1;65(3):1089–96.
363. Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol*. 2005 Feb;17(2):133–44.
364. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3381–5.
365. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005 Apr 15;11(8):2947–53.
366. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother Cll*. 2007 Aug;56(8):1173–82.
367. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3360–5.

368. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2151–7.
369. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007 Mar 15;13(6):1757–61.
370. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2455–65.
371. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443–54.
372. Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, Landes S, Kneller A, Leiba M, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 May 15;14(10):3044–51.
373. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet Lond Engl*. 2014 Sep 20;384(9948):1109–17.
374. Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M, et al. PD-1 Blockade in Mismatch Repair-Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *N Engl J Med*. 2022 Jun 23;386(25):2363–76.
375. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White Y, et al. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia*. 2009 Feb;23(2):375–82.
376. Xerri L, Chetaille B, Serriari N, Attias C, Guillaume Y, Arnoulet C, et al. Programmed death 1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Hum Pathol*. 2008 Jul;39(7):1050–8.
377. Grzywnowicz M, Zaleska J, Mertens D, Tomczak W, Wlasiuk P, Kosior K, et al. Programmed death-1 and its ligand are novel immunotolerant molecules expressed on leukemic B cells in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2012;7(4):e35178.
378. Greaves P, Clear A, Owen A, Wilson A, Matthews J, Calaminici M, et al. The PD1/PD-L1 Axis in the Classical Hodgkin Lymphoma Microenvironment: PD-1 Is Rarely Expressed but Identifies Patients with High-Risk Disease. *Blood*. 2011 Nov 18;118:1560–1560.
379. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3220–4.
380. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015 Jan 22;372(4):311–9.
381. Salik B, Smyth MJ, Nakamura K. Targeting immune checkpoints in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2020 Aug 12;13(1):111.

382. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):536–41.
383. Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat Rev Immunol*. 2020 Mar;20(3):173–85.
384. Rangachari M, Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Karman J, Chen A, et al. Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3–mediated cell death and exhaustion. *Nat Med*. 2012 Sep;18(9):1394–400.
385. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res*. 2013 Jan 1;73(1):128–38.
386. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest*. 2014 May;124(5):2246–59.
387. Granier C, Dariane C, Combe P, Verkarre V, Urien S, Badoual C, et al. Tim-3 Expression on Tumor-Infiltrating PD-1+CD8+ T Cells Correlates with Poor Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 2017 Mar 1;77(5):1075–82.
388. Sakuishi K, Ngiow SF, Sullivan JM, Teng MWL, Kuchroo VK, Smyth MJ, et al. TIM3+FOXP3+ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Apr 1;2(4):e23849.
389. da Silva IP, Gallois A, Jimenez-Baranda S, Khan S, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol Res*. 2014 May;2(5):410–22.
390. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*. 2010 Sep 27;207(10):2187–94.
391. Horlad H, Ohnishi K, Ma C, Fujiwara Y, Niino D, Ohshima K, et al. TIM-3 expression in lymphoma cells predicts chemoresistance in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncol Lett*. 2016 Aug;12(2):1519–24.
392. Jan M, Chao MP, Cha AC, Alizadeh AA, Gentles AJ, Weissman IL, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):5009–14.
393. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Okazaki T. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother Cancer*. 2020 Sep;8(2):e001014.
394. Guy C, Mitrea DM, Chou PC, Temirov J, Vignali KM, Liu X, et al. LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation. *Nat Immunol*. 2022 May;23(5):757–67.
395. Bettini M, Szymczak-Workman AL, Forbes K, Castellaw AH, Selby M, Pan X, et al. Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Oct 1;187(7):3493–8.

396. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):503–13.
397. Do JS, Vesperas A, Sanogo YO, Bechtel JJ, Dvorina N, Kim S, et al. An IL-27/Lag3 axis enhances Foxp3+ regulatory T cell-suppressive function and therapeutic efficacy. *Mucosal Immunol*. 2016 Jan;9(1):137–45.
398. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res*. 2012 Feb 15;72(4):917–27.
399. Huang RY, Eppolito C, Lele S, Shrikant P, Matsuzaki J, Odunsi K. LAG3 and PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8+ T cell signaling and dampen antitumor immunity in a murine ovarian cancer model. *Oncotarget*. 2015 Sep 29;6(29):27359–77.
400. Ngiow SF, von Scheidt B, Akiba H, Yagita H, Teng MWL, Smyth MJ. Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN- γ -mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. *Cancer Res*. 2011 May 15;71(10):3540–51.
401. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, Ascierto PA, Matamala L, Castillo Gutiérrez E, et al. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2022 Jan 6;386(1):24–34.
402. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*. 2003 Aug 18;198(4):557–67.
403. Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Onoda Y, Zhang H, Yamazaki S, Miyamoto A, et al. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol*. 2004 Apr;16(4):533–8.
404. Shibuya A, Shibuya K. DNAM-1 versus TIGIT: competitive roles in tumor immunity and inflammatory responses. *Int Immunol*. 2021 Nov 25;33(12):687–92.
405. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):48–57.
406. Joller N, Hafler JP, Brynedal B, Kassam N, Spoerl S, Levin SD, et al. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Feb 1;186(3):1338–42.
407. Wen J, Mao X, Cheng Q, Liu Z, Liu F. A pan-cancer analysis revealing the role of TIGIT in tumor microenvironment. *Sci Rep*. 2021 Nov 18;11(1):22502.
408. Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Apr 15;188(8):3869–75.
409. Kurtulus S, Sakuishi K, Ngiow SF, Joller N, Tan DJ, Teng MWL, et al. TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2015 Nov 2;125(11):4053–62.
410. Joller N, Lozano E, Burkett PR, Patel B, Xiao S, Zhu C, et al. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity*. 2014 Apr 17;40(4):569–81.

411. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell*. 2014 Dec 8;26(6):923–37.
412. Guillerey C, Harjunpää H, Carrié N, Kassem S, Teo T, Miles K, et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8+ T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood*. 2018 Oct 18;132(16):1689–94.
413. Cho BC, Abreu DR, Hussein M, Cobo M, Patel AJ, Secen N, et al. Tiragolumab plus atezolizumab versus placebo plus atezolizumab as a first-line treatment for PD-L1-selected non-small-cell lung cancer (CITYSCAPE): primary and follow-up analyses of a randomised, double-blind, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2022 Jun;23(6):781–92.
414. Rousseau A, Parisi C, Barlesi F. Anti-TIGIT therapies for solid tumors: a systematic review. *ESMO Open*. 2023 Apr;8(2):101184.
415. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*. 1999 Dec 16;402(6763):827–32.
416. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):263–6.
417. Li DY, Xiong XZ. ICOS+ Tregs: A Functional Subset of Tregs in Immune Diseases. *Front Immunol*. 2020;11:2104.
418. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2003 Mar;4(3):261–8.
419. Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Skrabl-Baumgartner A, Schwinger W, van der Burg M, et al. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3045–52.
420. Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity*. 1999 Oct;11(4):423–32.
421. Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*. 2001 Jan 4;409(6816):97–101.
422. Xiao Z, Mayer AT, Nobashi TW, Gambhir SS. ICOS Is an Indicator of T-cell-Mediated Response to Cancer Immunotherapy. *Cancer Res*. 2020 Jul 15;80(14):3023–32.
423. Fan X, Quezada SA, Sepulveda MA, Sharma P, Allison JP. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med*. 2014 Apr 7;211(4):715–25.
424. Solinas C, Gu-Trantien C, Willard-Gallo K. The rationale behind targeting the ICOS-ICOS ligand costimulatory pathway in cancer immunotherapy. *ESMO Open*. 2020 Jan;5(1):e000544.
425. Sainson RCA, Thotakura AK, Kosmac M, Borhis G, Parveen N, Kimber R, et al. An Antibody Targeting ICOS Increases Intratumoral Cytotoxic to Regulatory T-cell Ratio and Induces Tumor Regression. *Cancer Immunol Res*. 2020 Dec;8(12):1568–82.
426. Zhang Q, Wang H, Kantekure K, Paterson JC, Liu X, Schaffer A, et al. Oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK induces expression of the growth-promoting receptor ICOS. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3062–71.

427. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*. 2009 Apr;9(4):271–85.
428. Redmond WL, Triplett T, Floyd K, Weinberg AD. Dual anti-OX40/IL-2 therapy augments tumor immunotherapy via IL-2R-mediated regulation of OX40 expression. *PLoS One*. 2012;7(4):e34467.
429. Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol*. 2010;28:57–78.
430. Turaj AH, Cox KL, Penfold CA, French RR, Mockridge CI, Willoughby JE, et al. Augmentation of CD134 (OX40)-dependent NK anti-tumour activity is dependent on antibody cross-linking. *Sci Rep*. 2018 Feb 2;8(1):2278.
431. Voo KS, Foglietta M, Percivalle E, Chu F, Nattamai D, Harline M, et al. Selective targeting of Toll-like receptors and OX40 inhibit regulatory T-cell function in follicular lymphoma. *Int J Cancer*. 2014 Dec 15;135(12):2834–46.
432. Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, et al. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Mar 15;172(6):3580–9.
433. Gough MJ, Ruby CE, Redmond WL, Dhungel B, Brown A, Weinberg AD. OX40 agonist therapy enhances CD8 infiltration and decreases immune suppression in the tumor. *Cancer Res*. 2008 Jul 1;68(13):5206–15.
434. Weinberg AD, Rivera MM, Prell R, Morris A, Ramstad T, Vetto JT, et al. Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Feb 15;164(4):2160–9.
435. Redmond WL, Linch SN, Kasiewicz MJ. Combined targeting of costimulatory (OX40) and coinhibitory (CTLA-4) pathways elicits potent effector T cells capable of driving robust antitumor immunity. *Cancer Immunol Res*. 2014 Feb;2(2):142–53.
436. Guo Z, Wang X, Cheng D, Xia Z, Luan M, Zhang S. PD-1 blockade and OX40 triggering synergistically protects against tumor growth in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One*. 2014;9(2):e89350.
437. Diab A, Hamid O, Thompson JA, Ros W, Eskens FALM, Doi T, et al. A Phase I, Open-Label, Dose-Escalation Study of the OX40 Agonist Ivuxolimab in Patients with Locally Advanced or Metastatic Cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2022 Jan 1;28(1):71–83.
438. Davis EJ, Martin-Liberal J, Kristeleit R, Cho DC, Blagden SP, Berthold D, et al. First-in-human phase I/II, open-label study of the anti-OX40 agonist INCAGN01949 in patients with advanced solid tumors. *J Immunother Cancer*. 2022 Oct;10(10):e004235.
439. Postel-Vinay S, Lam VK, Ros W, Bauer TM, Hansen AR, Cho DC, et al. First-in-human phase I study of the OX40 agonist GSK3174998 with or without pembrolizumab in patients with selected advanced solid tumors (ENGAGE-1). *J Immunother Cancer*. 2023 Mar;11(3):e005301.
440. Goldman JW, Piha-Paul SA, Curti B, Pedersen KS, Bauer TM, Groenland SL, et al. Safety and Tolerability of MEDI0562, an OX40 Agonist mAb, in Combination with Durvalumab or Tremelimumab in Adult Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2022 Sep 1;28(17):3709–19.

441. Schwarz H, Valbracht J, Tuckwell J, von Kempis J, Lotz M. ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood*. 1995 Feb 15;85(4):1043–52.
442. Kwon BS, Weissman SM. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Mar;86(6):1963–7.
443. Vinay DS, Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol*. 1998 Dec;10(6):481–9.
444. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhali M, Suhoski MM, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3360–5.
445. Stephan MT, Ponomarev V, Brentjens RJ, Chang AH, Dobrenkov KV, Heller G, et al. T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nat Med*. 2007 Dec;13(12):1440–9.
446. Chester C, Sanmamed MF, Wang J, Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood*. 2018 Jan 4;131(1):49–57.
447. Wolfl M, Kuball J, Ho WY, Nguyen H, Manley TJ, Bleakley M, et al. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):201–10.
448. Houot R, Goldstein MJ, Kohrt HE, Myklebust JH, Alizadeh AA, Lin JT, et al. Therapeutic effect of CD137 immunomodulation in lymphoma and its enhancement by Treg depletion. *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3431–8.
449. Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellström KE, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med*. 1997 Jun;3(6):682–5.
450. McKee SJ, Doff BL, Soon MSF, Mattarollo SR. Therapeutic Efficacy of 4-1BB Costimulation Is Abrogated by PD-1 Blockade in a Model of Spontaneous B-cell Lymphoma. *Cancer Immunol Res*. 2017 Mar;5(3):191–7.
451. Pichler AC, Carrié N, Cuisinier M, Ghazali S, Voisin A, Axisa PP, et al. TCR-independent CD137 (4-1BB) signaling promotes CD8+ exhausted T cell proliferation and terminal differentiation. *Immunity*. 2023 Jul 11;56(7):1631-1648.e10.
452. Segal NH, Logan TF, Hodi FS, McDermott D, Melero I, Hamid O, et al. Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Apr 15;23(8):1929–36.
453. Segal NH, He AR, Doi T, Levy R, Bhatia S, Pishvaian MJ, et al. Phase I Study of Single-Agent Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018 Apr 15;24(8):1816–23.
454. Claus C, Ferrara-Koller C, Klein C. The emerging landscape of novel 4-1BB (CD137) agonistic drugs for cancer immunotherapy. *mAbs*. 2023;15(1):2167189.
455. Ku G, Bendell JC, Tolcher AW, Hurvitz SA, Krishnamurthy A, El-Khoueiry AB, et al. 5250 A phase I dose escalation study of PRS-343, a HER2/4-1BB bispecific molecule, in patients with HER2-positive malignancies. *Ann Oncol*. 2020 Sep 1;31:S462–3.

456. Medler J, Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets*. 2019 Apr;23(4):295–307.
457. Ye LL, Wei XS, Zhang M, Niu YR, Zhou Q. The Significance of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in CD8+ Regulatory T Cells and CD8+ Effector T Cells. *Front Immunol*. 2018;9:583.
458. Kim EY, Teh SJ, Yang J, Chow MT, Teh HS. TNFR2-deficient memory CD8 T cells provide superior protection against tumor cell growth. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Nov 15;183(10):6051–7.
459. Otano I, Alvarez M, Minute L, Ochoa MC, Migueliz I, Molina C, et al. Human CD8 T cells are susceptible to TNF-mediated activation-induced cell death. *Theranostics*. 2020;10(10):4481–9.
460. Moatti A, Cohen JL. The TNF- α /TNFR2 Pathway: Targeting a Brake to Release the Anti-tumor Immune Response. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:725473.
461. Ungewickell A, Bhaduri A, Rios E, Reuter J, Lee CS, Mah A, et al. Genomic analysis of mycosis fungoides and Sézary syndrome identifies recurrent alterations in TNFR2. *Nat Genet*. 2015 Sep;47(9):1056–60.
462. Meng Y, Zhao Q, An L, Jiao S, Li R, Sang Y, et al. A TNFR2-hnRNPK Axis Promotes Primary Liver Cancer Development via Activation of YAP Signaling in Hepatic Progenitor Cells. *Cancer Res*. 2021 Jun 1;81(11):3036–50.
463. Zhao T, Li H, Liu Z. Tumor necrosis factor receptor 2 promotes growth of colorectal cancer via the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett*. 2017 Jan;13(1):342–6.
464. Babic A, Shah SM, Song M, Wu K, Meyerhardt JA, Ogino S, et al. Soluble tumour necrosis factor receptor type II and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016 Apr 26;114(9):995–1002.
465. Heemann C, Kreuz M, Stoller I, Schoof N, von Bonin F, Ziepert M, et al. Circulating levels of TNF receptor II are prognostic for patients with peripheral T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Jul 1;18(13):3637–47.
466. Moatti A, Debesset A, Pilon C, Beldi-Ferchiou A, Leclerc M, Redjoul R, et al. TNFR2 blockade of regulatory T cells unleashes an antitumor immune response after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Immunother Cancer*. 2022 Apr;10(4):e003508.
467. Chen Y, Jia M, Wang S, Xu S, He N. Antagonistic Antibody Targeting TNFR2 Inhibits Regulatory T Cell Function to Promote Anti-Tumor Activity. *Front Immunol*. 2022;13:835690.
468. Torrey H, Khodadoust M, Tran L, Baum D, Defusco A, Kim YH, et al. Targeted killing of TNFR2-expressing tumor cells and Tregs by TNFR2 antagonistic antibodies in advanced Sézary syndrome. *Leukemia*. 2019 May;33(5):1206–18.
469. Tam EM, Fulton RB, Sampson JF, Muda M, Camblin A, Richards J, et al. Antibody-mediated targeting of TNFR2 activates CD8+ T cells in mice and promotes antitumor immunity. *Sci Transl Med*. 2019 Oct 2;11(512):eaax0720.
470. de Andrade Mello P, Coutinho-Silva R, Savio LEB. Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol*. 2017;8:1526.

471. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*. 2001 Dec 20;414(6866):916–20.
472. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MKK, et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 29;103(35):13132–7.
473. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1257–65.
474. Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev*. 1998 Feb;161:95–109.
475. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Déjou C, Giustiniani J, Laheurte C, et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res*. 2015 Mar;3(3):254–65.
476. Xia C, Yin S, To KKW, Fu L. CD39/CD73/A2AR pathway and cancer immunotherapy. *Mol Cancer*. 2023 Mar 2;22(1):44.
477. Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enyoji K, Cszimadia E, et al. Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice. *Am J Pathol*. 2007 Oct;171(4):1395–404.
478. Sun X, Wu Y, Gao W, Enyoji K, Cszimadia E, Müller CE, et al. CD39/ENTPD1 expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology*. 2010 Sep;139(3):1030–40.
479. Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemelä J, Laurila JP, Elima K, et al. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol*. 2011 May;41(5):1231–41.
480. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 26;107(4):1547–52.
481. Yan J, Li XY, Roman Aguilera A, Xiao C, Jacobberger-Foissac C, Nowlan B, et al. Control of Metastases via Myeloid CD39 and NK Cell Effector Function. *Cancer Immunol Res*. 2020 Mar;8(3):356–67.
482. Hay CM, Sult E, Huang Q, Mulgrew K, Fuhrmann SR, McGlinchey KA, et al. Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447. *Oncoimmunology*. 2016 Aug;5(8):e1208875.
483. Allard B, Pommey S, Smyth MJ, Stagg J. Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013 Oct 15;19(20):5626–35.
484. Chiappori AA, Creelan B, Tanvetyanon T, Gray JE, Haura EB, Thapa R, et al. Phase I Study of Taminadenant (PBF509/NIR178), an Adenosine 2A Receptor Antagonist, with or without Spartalizumab (PDR001), in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2022 Jun 1;28(11):2313–20.
485. Lim EA, Bendell JC, Falchook GS, Bauer TM, Drake CG, Choe JH, et al. Phase Ia/b, Open-Label, Multicenter Study of AZD4635 (an Adenosine A2A Receptor Antagonist) as Monotherapy or Combined with Durvalumab, in Patients with Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2022 Nov 14;28(22):4871–84.

486. Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, et al. PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 May 14;116(20):9999–10008.
487. Wakiyama H, Kato T, Furusawa A, Okada R, Inagaki F, Furumoto H, et al. Treg-Dominant Tumor Microenvironment Is Responsible for Hyperprogressive Disease after PD-1 Blockade Therapy. *Cancer Immunol Res*. 2022 Nov 2;10(11):1386–97.
488. Safarzadeh Kozani P, Safarzadeh Kozani P, Rahbarizadeh F. CAR-T cell therapy in T-cell malignancies: Is success a low-hanging fruit? *Stem Cell Res Ther*. 2021 Oct 7;12(1):527.
489. Boardman AP, Salles G. CAR T-cell therapy in large B cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2023 Jun;41 Suppl 1(Suppl 1):112–8.
490. Ardeshtna KM, Marzolini MAV, Norman J, Al-Hajj M, Thomas S, Faulkner J, et al. Phase 1/2 Study of AUTO3 the First Bicistronic Chimeric Antigen Receptor (CAR) Targeting CD19 and CD22 Followed By an Anti-PD1 in Patients with Relapsed/Refractory (r/r) Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL): Results of Cohort 1 and 2 of the Alexander Study. *Blood*. 2019 Nov 13;134:246.
491. Jacobson CA, Locke FL, Miklos DB, Herrera AF, Westin JR, Lee J, et al. End of Phase 1 Results from Zuma-6: Axicabtagene Ciloleucef (Axi-Cel) in Combination with Atezolizumab for the Treatment of Patients with Refractory Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 Mar 1;25(3, Supplement):S173.
492. Katz DA, Morris JD, Chu MP, David KA, Thieblemont C, Morley NJ, et al. Open-label, phase 2 study of blinatumomab after frontline R-chemotherapy in adults with newly diagnosed, high-risk DLBCL. *Leuk Lymphoma*. 2022 Sep;63(9):2063–73.
493. Thieblemont C, Phillips T, Ghesquieres H, Cheah CY, Clausen MR, Cunningham D, et al. Epcoritamab, a Novel, Subcutaneous CD3xCD20 Bispecific T-Cell-Engaging Antibody, in Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma: Dose Expansion in a Phase I/II Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2023 Apr 20;41(12):2238–47.
494. Dickinson MJ, Carlo-Stella C, Morschhauser F, Bachy E, Corradini P, Iacoboni G, et al. Glofitamab for Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2022 Dec 15;387(24):2220–31.
495. Zhu Q, Deng X, Yao W, Chen Z, Ye Y, Gao L, et al. Novel tumour-infiltrating lymphocyte-related risk stratification based by flow cytometry for patients with de novo angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2021 Mar;100(3):715–23.
496. Sugio T, Miyawaki K, Kato K, Sasaki K, Yamada K, Iqbal J, et al. Microenvironmental immune cell signatures dictate clinical outcomes for PTCL-NOS. *Blood Adv*. 2018 Sep 11;2(17):2242–52.
497. Chen Z, Zhu Q, Deng X, Yao W, Zhang W, Liu W, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with predominant CD8+ tumor-infiltrating T-cells is a distinct immune pattern with an immunosuppressive microenvironment. *Front Immunol*. 2022;13:987227.
498. Lundberg J, Berglund D, Molin D, Kinch A. Intratumoral expression of FoxP3-positive regulatory T-cells in T-cell lymphoma: no correlation with survival. *Ups J Med Sci*. 2019 Apr;124(2):105–10.
499. Bruneau J, Canioni D, Renand A, Marafioti T, Paterson JC, Martin-Garcia N, et al. Regulatory T-cell depletion in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2010 Aug;177(2):570–4.

500. Pritchett JC, Yang ZZ, Kim HJ, Villasboas JC, Tang X, Jalali S, et al. High-dimensional and single-cell transcriptome analysis of the tumor microenvironment in angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL). *Leukemia*. 2022 Jan;36(1):165–76.
501. Enblad G, Hagberg H, Erlanson M, Lundin J, MacDonald AP, Repp R, et al. A pilot study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) therapy for patients with relapsed or chemotherapy-refractory peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 2004 Apr 15;103(8):2920–4.
502. Ogura M, Ishida T, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, et al. Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-cc chemokine receptor 4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014 Apr 10;32(11):1157–63.
503. Hamadani M, Collins GP, Caimi PF, Samaniego F, Spira A, Davies A, et al. Camidanlumab tesirine in patients with relapsed or refractory lymphoma: a phase 1, open-label, multicentre, dose-escalation, dose-expansion study. *Lancet Haematol*. 2021 Jun;8(6):e433–45.
504. d'Amore F, Radford J, Relander T, Jerkeman M, Tilly H, Osterborg A, et al. Phase II trial of zanolimumab (HuMax-CD4) in relapsed or refractory non-cutaneous peripheral T cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2010 Sep;150(5):565–73.
505. Altmann B, Wulf G, Truemper L, d'Amore F, Relander T, Toldbod H, et al. Alemtuzumab Added to CHOP for Treatment of Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL) in Previously Untreated Young and Elderly Patients: Pooled Analysis of the International ACT-1/2 Phase III Trials. *Blood*. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):1622.
506. Wulf GG, Altmann B, Ziepert M, D'Amore F, Held G, Greil R, et al. Alemtuzumab plus CHOP versus CHOP in elderly patients with peripheral T-cell lymphoma: the DSHNHL2006-1B/ACT-2 trial. *Leukemia*. 2021 Jan;35(1):143–55.
507. Chavez JC, Foss FM, William BM, Brammer JE, Smith SM, Prica A, et al. Targeting the Inducible T-cell Costimulator (ICOS) in Patients with Relapsed/Refractory T-follicular Helper Phenotype Peripheral T-cell and Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2023 May 15;29(10):1869–78.
508. Rauch DA, Conlon KC, Janakiram M, Brammer JE, Harding JC, Ye BH, et al. Rapid progression of adult T-cell leukemia/lymphoma as tumor-infiltrating Tregs after PD-1 blockade. *Blood*. 2019 Oct 24;134(17):1406–14.
509. Barta SK, Zain J, MacFarlane AW, Smith SM, Ruan J, Fung HC, et al. Phase II Study of the PD-1 Inhibitor Pembrolizumab for the Treatment of Relapsed or Refractory Mature T-cell Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019 Jun;19(6):356-364.e3.
510. Iyer SP, Xu J, Becnel MR, Nair R, Steiner R, Feng L, et al. A Phase II Study of Pembrolizumab in Combination with Romidepsin Demonstrates Durable Responses in Relapsed or Refractory T-Cell Lymphoma (TCL). *Blood*. 2020 Nov 5;136(Supplement 1):40–1.
511. Bennani NN, Pederson LD, Atherton P, Micallef I, Colgan JP, Thanarajasingam G, et al. A Phase II Study of Nivolumab in Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma. *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):467.
512. Yoo HY, Kim P, Kim WS, Lee SH, Kim S, Kang SY, et al. Frequent CTLA4-CD28 gene fusion in diverse types of T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2016 Jun;101(6):757–63.

513. Pinz KG, Yakoboski E, Jares A, Liu H, Firor AE, Chen KH, et al. Targeting T-cell malignancies using anti-CD4 CAR NK-92 cells. *Oncotarget*. 2017 Dec 22;8(68):112783–96.
514. Maciocia PM, Wawrzyniecka PA, Philip B, Ricciardelli I, Akarca AU, Onuoha SC, et al. Targeting the T cell receptor β -chain constant region for immunotherapy of T cell malignancies. *Nat Med*. 2017 Dec;23(12):1416–23.
515. Wu Y, Chen D, Lu Y, Dong SC, Ma R, Tang WY, et al. A new immunotherapy strategy targeted CD30 in peripheral T-cell lymphomas: CAR-modified T-cell therapy based on CD30 mAb. *Cancer Gene Ther*. 2022 Feb;29(2):167–77.
516. Hill LC, Rouce RH, Smith TS, Yang L, Srinivasan M, Zhang H, et al. Safety and Anti-Tumor Activity of CD5 CAR T-Cells in Patients with Relapsed/Refractory T-Cell Malignancies. *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):199.
517. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):227–42.
518. Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, Yang ZZ, Comfere NI, Dong H, et al. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2009 Sep 3;114(10):2149–58.
519. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Feb 24;352(8):804–15.
520. Kay NE, Hampel PJ, Van Dyke DL, Parikh SA. CLL update 2022: A continuing evolution in care. *Blood Rev*. 2022 Jul 1;54:100930.
521. LLC - Les recommandations du FILO 2023 [Internet]. [cited 2023 Sep 25]. Available from: <https://www.filo-leucemie.org/actualites/traitements/llc-les-recommandations-du-filo-2023/>
522. Arruga F, Gyau BB, Iannello A, Vitale N, Vaisitti T, Deaglio S. Immune Response Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia: Dissecting Molecular Mechanisms and Microenvironmental Conditions. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 6;21(5):1825.
523. Teh BW, Tam CS, Handunnetti S, Worth LJ, Slavin MA. Infections in patients with chronic lymphocytic leukaemia: Mitigating risk in the era of targeted therapies. *Blood Rev*. 2018 Nov;32(6):499–507.
524. Solomon BM, Rabe KG, Slager SL, Brewer JD, Cerhan JR, Shanafelt TD. Overall and cancer-specific survival of patients with breast, colon, kidney, and lung cancers with and without chronic lymphocytic leukemia: a SEER population-based study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Mar 1;31(7):930–7.
525. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 2013 Feb 28;121(9):1612–21.
526. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, et al. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*. 2011 Dec 1;118(23):6141–52.
527. Mhibik M, Wiestner A, Sun C. Harnessing the Effects of BTKi on T Cells for Effective Immunotherapy against CLL. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 20;21(1):68.

528. Liu Y, Song Y, Yin Q. Effects of ibrutinib on T-cell immunity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Front Immunol*. 2022;13:962552.
529. Woyach JA. How I manage ibrutinib-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017 Mar 9;129(10):1270–4.
530. Vorobjev IA, Kussanova A, Barteneva NS. Development of Spectral Imaging Cytometry. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2023;2635:3–22.
531. McCausland M, Lin YD, Nevers T, Groves C, Decman V. With great power comes great responsibility: high-dimensional spectral flow cytometry to support clinical trials. *Bioanalysis*. 2021 Nov;13(21):1597–616.
532. Fujisawa M, Nguyen TB, Abe Y, Suehara Y, Fukumoto K, Suma S, et al. Clonal germinal center B cells function as a niche for T-cell lymphoma. *Blood*. 2022 Nov 3;140(18):1937–50.
533. Delfau-Larue MH, de Leval L, Joly B, Plonquet A, Challine D, Parrens M, et al. Targeting intratumoral B cells with rituximab in addition to CHOP in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. A clinicobiological study of the GELA. *Haematologica*. 2012 Oct;97(10):1594–602.
534. Attygalle AD, Kyriakou C, Dupuis J, Grogg KL, Diss TC, Wotherspoon AC, et al. Histologic evolution of angioimmunoblastic T-cell lymphoma in consecutive biopsies: clinical correlation and insights into natural history and disease progression. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jul;31(7):1077–88.
535. Seymour F, Cavenagh JD, Mathews J, Gribben JG. NK cells CD56bright and CD56dim subset cytokine loss and exhaustion is associated with impaired survival in myeloma. *Blood Adv*. 2022 Sep 13;6(17):5152–9.
536. Drieux F, Ruminy P, Abdel-Sater A, Lemonnier F, Viailly PJ, Fataccioli V, et al. Defining signatures of peripheral T-cell lymphoma with a targeted 20-marker gene expression profiling assay. *Haematologica*. 2020 Jun;105(6):1582–92.
537. Muñoz-García N, Lima M, Villamor N, Morán-Plata FJ, Barrena S, Mateos S, et al. Anti-TRBC1 Antibody-Based Flow Cytometric Detection of T-Cell Clonality: Standardization of Sample Preparation and Diagnostic Implementation. *Cancers*. 2021 Aug 30;13(17):4379.
538. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):670–84.
539. Querfeld C, Leung S, Myskowski PL, Curran SA, Goldman DA, Heller G, et al. Primary T Cells from Cutaneous T-cell Lymphoma Skin Explants Display an Exhausted Immune Checkpoint Profile. *Cancer Immunol Res*. 2018 Aug;6(8):900–9.
540. Heming M, Haessner S, Wolbert J, Lu IN, Li X, Brokinkel B, et al. Intratumor heterogeneity and T cell exhaustion in primary CNS lymphoma. *Genome Med*. 2022 Sep 24;14(1):109.
541. Yang ZZ, Liang AB, Ansell SM. T-cell-mediated antitumor immunity in B-cell non-Hodgkin lymphoma: activation, suppression and exhaustion. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(9):2498–504.
542. Sen DR, Kaminski J, Barnitz RA, Kurachi M, Gerdemann U, Yates KB, et al. The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science*. 2016 Dec 2;354(6316):1165–9.
543. Ansell SM, Lin Y. Immunotherapy of lymphomas. *J Clin Invest*. 2020 Apr 1;130(4):1576–85.

544. Li X, Liu Z, Mi M, Zhang C, Xiao Y, Liu X, et al. Identification of hub genes and key pathways associated with angioimmunoblastic T-cell lymphoma using weighted gene co-expression network analysis. *Cancer Manag Res.* 2019;11:5209–20.
545. Yu J, Song Y, Tian W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* 2020 May 5;13(1):45.
546. Beers SA, Glennie MJ, White AL. Influence of immunoglobulin isotype on therapeutic antibody function. *Blood.* 2016 Mar 3;127(9):1097–101.
547. Ha D, Tanaka A, Kibayashi T, Tanemura A, Sugiyama D, Wing JB, et al. Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jan 8;116(2):609–18.
548. Semmrich M, Marchand JB, Fend L, Rehn M, Remy C, Holmkvist P, et al. Vectorized Treg-depleting α CTLA-4 elicits antigen cross-presentation and CD8+ T cell immunity to reject ‘cold’ tumors. *J Immunother Cancer.* 2022 Jan;10(1):e003488.
549. van Hall T, André P, Horowitz A, Ruan DF, Borst L, Zerbib R, et al. Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. *J Immunother Cancer.* 2019 Oct 17;7(1):263.
550. Moesta AK, Li XY, Smyth MJ. Targeting CD39 in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2020 Dec;20(12):739–55.
551. Perrot I, Michaud HA, Giraudon-Paoli M, Augier S, Docquier A, Gros L, et al. Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. *Cell Rep.* 2019 May 21;27(8):2411-2425.e9.
552. Nagate Y, Ezoe S, Fujita J, Okuzaki D, Motooka D, Ishibashi T, et al. Ectonucleotidase CD39 is highly expressed on ATLL cells and is responsible for their immunosuppressive function. *Leukemia.* 2021 Jan;35(1):107–18.
553. Bensussan A, Janela B, Thonnart N, Bagot M, Musette P, Ginhoux F, et al. Identification of CD39 as a Marker for the Circulating Malignant T-Cell Clone of Sézary Syndrome Patients. *J Invest Dermatol.* 2019 Mar;139(3):725–8.
554. Nakamura K, Casey M, Oey H, Vari F, Stagg J, Gandhi MK, et al. Targeting an adenosine-mediated ‘don’t eat me signal’ augments anti-lymphoma immunity by anti-CD20 monoclonal antibody. *Leukemia.* 2020 Oct;34(10):2708–21.
555. Yang R, Elsaadi S, Misund K, Abdollahi P, Vandsemb EN, Moen SH, et al. Conversion of ATP to adenosine by CD39 and CD73 in multiple myeloma can be successfully targeted together with adenosine receptor A2A blockade. *J Immunother Cancer.* 2020 May;8(1):e000610.
556. Perry C, Hazan-Halevy I, Kay S, Cipok M, Grisaru D, Deutsch V, et al. Increased CD39 expression on CD4(+) T lymphocytes has clinical and prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2012 Aug;91(8):1271–9.
557. Li XY, Moesta AK, Xiao C, Nakamura K, Casey M, Zhang H, et al. Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity. *Cancer Discov.* 2019 Dec;9(12):1754–73.
558. Hilchey SP, Kobie JJ, Cochran MR, Secor-Socha S, Wang JCE, Hyrien O, et al. Human follicular lymphoma CD39+-infiltrating T cells contribute to adenosine-mediated T cell hyporesponsiveness. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2009 Nov 15;183(10):6157–66.

559. Sonigo G, Bozonnat A, Dumont M, Thonnart N, Ram-Wolff C, de Masson A, et al. Involvement of the CD39/CD73/adenosine pathway in T-cell proliferation and NK cell-mediated antibody-dependent cell cytotoxicity in Sézary syndrome. *Blood*. 2022 Apr 28;139(17):2712–6.
560. Jakša R, Karolová J, Svatoň M, Kazantsev D, Grajciarová M, Pokorná E, et al. Complex genetic and histopathological study of 15 patient-derived xenografts of aggressive lymphomas. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2022 Sep;102(9):957–65.
561. Boy M, Bisio V, Zhao LP, Guidez F, Schell B, Lereclus E, et al. Myelodysplastic Syndrome associated TET2 mutations affect NK cell function and genome methylation. *Nat Commun*. 2023 Feb 3;14(1):588.
562. Phillips D, Matusiak M, Gutierrez BR, Bhate SS, Barlow GL, Jiang S, et al. Immune cell topography predicts response to PD-1 blockade in cutaneous T cell lymphoma. *Nat Commun*. 2021 Nov 18;12(1):6726.
563. Phillips D, Rodig SJ, Jiang S. Editorial: Defining the Spatial Organization of Immune Responses to Cancer and Viruses In Situ. *Front Immunol*. 2022;13:847582.
564. Griffin GK, Weirather JL, Roemer MGM, Lipschitz M, Kelley A, Chen PH, et al. Spatial signatures identify immune escape via PD-1 as a defining feature of T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. *Blood*. 2021 Mar 11;137(10):1353–64.

Annexe 1. Revue : Stéphan P,
Lautraite R, Voisin A, Grinberg-Bleyer
Y. Transcriptional Control of
Regulatory T Cells in Cancer: Toward
Therapeutic Targeting?. *Cancers*
(*Basel*). 2020;12(11):3194. Published
2020 Oct 30.
doi:10.3390/cancers12113194

Review

Transcriptional Control of Regulatory T Cells in Cancer: Toward Therapeutic Targeting?

Pierre Stéphan [†] , Raphaëlle Lautreite [†], Allison Voisin and Yenkel Grinberg-Bleyer ^{*}

Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France; pierre.stephan@lyon.unicancer.fr (P.S.); raphaelle.lautreite@inserm.fr (R.L.); allison.voisin@inserm.fr (A.V.)

^{*} Correspondence: yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr; Tel.: +33-(0)-469-856-248

[†] These authors contributed equally to this paper.

Received: 9 October 2020; Accepted: 28 October 2020; Published: 30 October 2020



Simple Summary: Cancer outcomes are often indexed to the quality of the immune response to the tumor. Among immune cells, Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg cells) are potent inhibitors of cancer immunity, and their presence within solid tumors is generally associated with a poor prognosis. Thus, understanding how Treg cell identity is controlled, is of utmost importance for the development of novel anti-cancer therapies. In this review, we summarize the current knowledge on the different intracellular pathways involved in the programming of Treg cell homeostasis and functions in cancer. We also highlight the therapeutic approaches aiming at targeting these regulators to enhance anti-tumor immunity.

Abstract: Extensive research in the past decades has highlighted the tight link between immunity and cancer, leading to the development of immunotherapies that have revolutionized cancer care. However, only a fraction of patients display durable responses to these treatments, and a deeper understanding of the cellular and mechanisms orchestrating immune responses to tumors is mandatory for the discovery of novel therapeutic targets. Among the most scrutinized immune cells, Forkhead Box Protein P3 (Foxp3)⁺ Regulatory T cells (Treg cells) are central inhibitors of protective anti-tumor immunity. These tumor-promoting functions render Treg cells attractive immunotherapy targets, and multiple strategies are being developed to inhibit their recruitment, survival, and function in the tumor microenvironment. In this context, it is critical to decipher the complex and multi-layered molecular mechanisms that shape and stabilize the Treg cell transcriptome. Here, we provide a global view of the transcription factors, and their upstream signaling pathways, involved in the programming of Treg cell homeostasis and functions in cancer. We also evaluate the feasibility and safety of novel therapeutic approaches aiming at targeting specific transcriptional regulators.

Keywords: regulatory T cells; cancer; transcription; immunotherapy

1. Introduction

Forkhead Box Protein P3 (Foxp3)⁺ regulatory T (Treg) cells compose 5–20% of the total CD4⁺ T cell pool. Their primary and most described function is to maintain immune tolerance and prevent autoimmunity at all time [1]. This is illustrated by the systemic autoimmune syndrome observed in Scurfy mice and Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked (IPEX) patients who carry mutations in *Foxp3* and after the ablation of Treg cells in young and adult mice [2–5]. In addition, through their multiple mechanisms of suppression, Treg cells are involved in the inhibition of a wide variety of immune responses, ranging from infection to cancer immunity [6]. Studies conducted in preclinical murine models have established the deleterious function of Treg cells in cancer. Indeed,

genetic and antibody-mediated depletion of Treg cells enhances tumor immunity and reduces tumor burden in many settings [7,8]. These conclusions have been largely confirmed in cancer patients, where the accumulation of Treg cells in the blood and tumor tissues is generally indicative of poor prognosis, though several exceptions, such as colorectal cancer, have been identified [9]. Because of this deleterious facet, the development of therapies aiming at modulating Treg recruitment, accumulation, and function in the tumor microenvironment is an area of extensive investigation in the field of cancer immunotherapy. As a prominent example, anti-Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4) antibodies, the first approved checkpoint-blockade therapy for cancer, were shown to exert their beneficial effects in cancer by decreasing Treg cells in mouse models [10], though the relevance of this mechanism in patients is still under debate [11,12]. The effect of Programmed Death-1 (PD-1) blockade on Treg cells and its contribution to therapeutic efficacy is also under scrutiny (reviewed in [13]). Interestingly, it was suggested that PD-1 inhibition on Treg cells may contribute to the hyperprogressive disease observed in a number of patients with gastric cancer [14]. Together, this demonstrates the central role of Treg cells in cancer immunotherapy. Cutting-edge technologies now provide scientists with the ability to comprehend the complexity of Treg cell populations and their molecular regulation to highlight additional therapeutic targets.

2. An Overview of Treg Cell Subsets and Their Transcriptional Regulation

The existence of different flavors of Treg cells underlies their large panel of functions. First, Treg cells can either develop in the thymus (tTreg) or differentiate in peripheral lymphoid tissues from naïve conventional (Tconv) cells (pTreg cells and their *in vitro* relatives, iTreg). To date, whether these two populations rely on shared or distinct transcription factor activity remains unclear. The proper development of Treg cells relies on a large number of transcriptional and epigenetic regulators, either for their survival or for the expression of Foxp3 or its stabilization. These mechanisms have been largely deciphered elsewhere [15,16], and we will therefore focus our review on the transcriptional regulation of mature Foxp3⁺ Treg cells.

Treg cell subsets can also be defined based on their activation status. Whereas naïve-like Resting cells (rTreg) are primarily found in lymphoid tissues, engagement of the T-Cell Receptor (TCR) and its co-stimulation partner CD28, as well as members of the Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily (TNFRSFs), drives the maturation of rTreg cells to a highly immunosuppressive Activated subset (aTreg cells, also known as effector eTreg cells) [17]. aTreg cells migrate to non-lymphoid tissues, where they maintain tissue homeostasis and potently suppress ongoing immune responses. In particular, aTreg cells are highly abundant in the tumor microenvironment and express a large panel of immune checkpoints (i.e., inhibitory and stimulatory surface receptors), making their regulation an important aspect in the development of immune checkpoint-blockade therapies [18,19] (Figure 1).

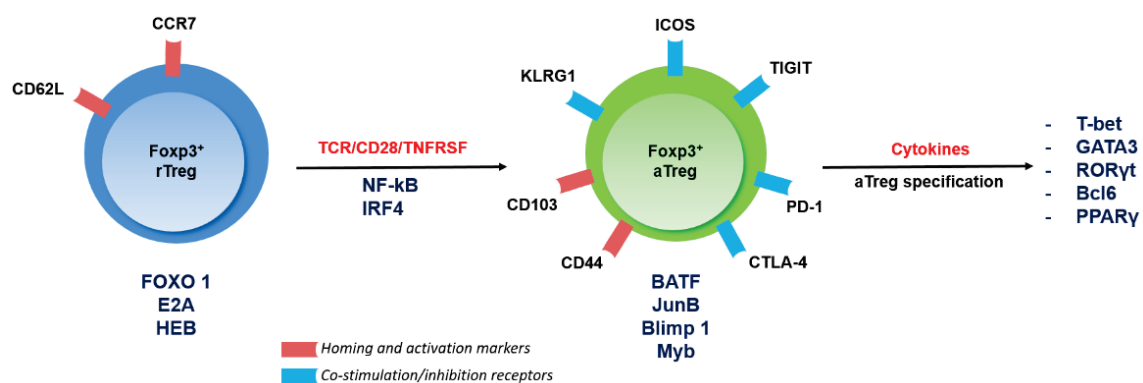


Figure 1. Activation steps of regulatory T cells (Treg cells) and their transcriptional regulation. The figure depicts the main transcription factors involved in the programming and maintenance of Treg cell subsets and highlights the expression of a numbers of surface receptors being targeted in cancer immunotherapy.

This immense regulatory power is under tight transcriptional control. Foxp3 is the master transcription factor of Treg cells, as it provides them with their suppressive function and largely establishes their transcriptomic pattern [20,21]. Moreover, Foxp3 can interact with a myriad other transcriptional regulators, thereby enabling potent repression or activation of gene expression [22,23]. Downstream of the TCR/CD28/TNFRSF signaling cascades, a number of transcription factors are essential for the specification of the aTreg subset. Briefly, Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4), Myb, and Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) seem to kick-start the aTreg specification program [24–27], whereas Basic Leucine Zipper Transcription Factor (BATF), B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp1), JunB, and Myb are then required to establish and maintain the aTreg landscape [24,28]. Importantly, negative regulators of the aTreg program have been described, such as Forkhead Box protein O (Foxo) or E-protein transcription factors [29,30]. At a more advanced level of differentiation, aTreg cells can acquire the expression of tissue- or microenvironment-induced transcription factors historically linked to the polarization of Tconv cells into Thelper (TH) subsets. Indeed, T-Box Expressed in T cells (T-bet), GATA Binding Protein 3 (GATA3), Retinoic Acid Receptor (RAR)-related Orphan Receptor (ROR) γ t, and B-Cell Lymphoma 6 protein (Bcl6), hallmarks of TH1, TH2, TH17, and T follicular helper cells, respectively, can also be expressed by aTreg cells and contribute to the diverse and highly adaptive functions of this population [31]. This precise molecular regulation of Treg cell identity has major implications for the regulation of cancer immunity that we will now emphasize.

3. Signaling Pathways and Transcription Factors in Treg Cells in Cancer

3.1. Foxp3

Because of its critical function in shaping the Treg cell transcriptome and function, Foxp3 itself is an attractive target for cancer immunotherapy. Several groups have identified small-molecule inhibitors able to impair Foxp3 nuclear translocation dimerization or its interaction with known partners such as Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) [32–34]. Interestingly, all these inhibitors had a significant therapeutic effect on syngeneic murine tumors when administered with a peptide vaccine or anti-Programmed cell Death 1 (PD-1) checkpoint-blockade therapy. However, one of the major obstacles to further developing such therapies is the expression of FOXP3 by non-Treg cells in humans [35,36]. In recent years, alternative strategies have aimed at targeting Foxp3 cofactors or other pathways, transcription factors, and epigenetic regulators involved in Treg cell biology in cancer; these will be the focus of this review.

3.2. IRF4

Irf4 (encoding IRF4), whose expression in T cells is driven by TCR engagement, is important in many aspects of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell biology [37]. In addition, IRF4 is one of the master regulators of aTreg generation [24] and was described as critical for the maintenance of peripheral immune homeostasis. Indeed, conditional ablation of *Irf4* in Treg cells leads to a multifocal and lethal autoimmune disease [38]. More recently, it was shown that IRF4 expression also defines the activated subset of tumor-infiltrating Treg cells in patients with lung cancer and may even regulate the human aTreg phenotype [39]. Furthermore, this tumor-promoting function was demonstrated in mice with tamoxifen-induced ablation of *Irf4* in Treg cells, which display reduced growth of transplanted colon adenocarcinoma [39]. Because IRF4 may also promote T conv cell exhaustion [40], it is emerging as a promising target in cancer.

3.3. The Complex Functions of the PI3K/AKT/Foxo Axis

Induced in T cells by CD28 engagement among other signals, the Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/AKT signaling cascade is well recognized for its critical role in the activation of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) complex, which serves as a central metabolic rheostat. Aside from this

function, AKT also phosphorylates the Foxo1 transcription factor, promoting its exclusion from the nucleus. The function of this axis in Treg cells, especially in the context of cancer, has been under scrutiny in recent years. Historically, it was shown that Treg cells have impaired AKT and mTOR activity, suggesting that the pathway could be expendable or even deleterious for their homeostasis. In support of this latter hypothesis, genetic disruption or chemical inhibition of the phosphatase Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) that leads to exacerbated activation of AKT, drives the conversion of Treg cells into Tconv cells and a significant arrest in tumor growth [41]. Similar results were found upon Treg-restricted ablation of the Neuropilin-1 surface receptor, which normally triggers PTEN recruitment [42,43]. However, at odds with this conclusion, ablation of the PI3K *p110δ* isoform in Tregs, also leads to major delays in the growth of several types of cancers [44,45]. Administration of the *p110δ*-selective inhibitor PI-3065, as well as other PI3K and AKT inhibitors, has a marked therapeutic effect in preclinical models [44,46]. Similarly, another *p110δ* inhibitor was shown to strongly inhibit human Treg cell proliferation and function in *in vivo* assays [47].

Together, this suggests that a balanced activation of the PI3K/AKT pathway is mandatory for the proper suppression of anti-tumor responses by Treg cells. In line with this, both the inactivation and constitutive activation of Foxo1 in Treg cells (using *Foxo1^{fllox}* and non-degradable *Foxo1^{CA/CA}* constructs, respectively), lead to multifocal autoimmune syndromes [30,48]. However, *Foxo1^{CA/+}* mice expressing only one copy of the transgene, do not develop autoimmunity but mount strong anti-tumor immune responses, resulting in reduced tumor growth in spontaneous and transplanted cancer models [30]. This could be attributed to a reduced accumulation of Treg cells in the tumor microenvironment. Specifically, Foxo1, while important for the initiation of *Foxp3* expression, is actually an inhibitor of the aTreg cell program. Consequently, *Foxo1^{CA}* Treg cells fail to upregulate aTreg genes and to migrate to the tumor tissue. In conclusion, even though growing evidence highlights the PI3K/AKT/Foxo axis as an attractive therapeutic target for cancer immunotherapy, one should be cautious when it comes to the specificity, the duration, and the dose–effect of this type of treatment.

3.4. Helios

Helios, encoded by *Ikzf2*, is a member of the Ikaros family of transcription factors and expressed by Treg but not Tconv cells in mice [49]. It was originally described that the expression of Helios could be enriched in mouse tTreg when compared to pTreg, though this finding was later debated [50,51]. In addition to this phenotypic hallmark, Helios also supports the identity of Treg cells. Germline deletion or conditional ablation of *Ikzf2* in Treg cells leads to a multifocal autoimmune syndrome detectable from 5 to 6 months of age. Indeed, Treg cells from these animals are present in normal numbers but exhibit impaired suppressive functions *in vivo* [49,52]. Consequently, melanoma and colon adenocarcinoma growth is significantly delayed in mutant mice [53]. This is associated with an unstable phenotype consisting of enhanced expression of inflammatory cytokines, such as Interferon (IFN) γ or Granzyme B, by tumor-infiltrating Helios-deficient Treg cells [54]. It was also proposed that the expression of Helios by human Treg cells may promote leukemic cell survival and angiogenesis in *in vitro* assays [55]. Overall, and because it is mainly expendable for Tconv cell function [56], Helios represents an attractive target for cancer immunotherapy. Consistently, it was proposed that agonistic anti-Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein (GITR) antibodies may exert their anti-tumor functions by down-modulating Helios expression in Treg cells [53].

3.5. Eos

Eos (encoded by *Ikzf4*), another member of the Ikaros family, is also critical in Treg cell biology. Eos is highly expressed by Treg cells, although *in vitro* stimulated Tconv cells can express substantial levels of the protein, and physically interacts with Foxp3 to help mediate Foxp3-mediated gene repression in Treg cells [57,58]. Eos is mainly expendable for Tconv cell function *in vivo* [58]. In contrast, *Ikzf4* knock-down or knock-out drives loss of numerous Treg-specific genes and expression of Tconv-associated genes [57]. Consequently, mice with conditional ablation of *Ikzf4* in Treg cells develop a lymphoproliferative and

autoimmune syndrome starting 3 months after birth [59]. This loss of in vivo functionality also leads to impaired suppression of anti-tumor immunity, as shown by the increased T-cell infiltration and function and reduced burden of colon cancer in mutant animals [59].

3.6. The Nr4a Family

The Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A (Nr4a) family of orphan nuclear receptors is composed of 3 members encoded by *Nr4a1* (Nur77), *Nr4a2* (Nurr1), and *Nr4a3* (Nor1). In T cells, Nr4a expression is induced by TCR signaling in a dose-dependent manner. Interestingly, the expression of the 3 proteins is higher in Treg than in Tconv cells, likely because of the supposedly high autoreactivity of Treg cells [60]. Mechanistically, Nr4a proteins largely regulate the expression of *Foxp3* itself and of Treg-signature genes [61,62]. Nr4a-deficient Treg cells express many inflammatory genes of the TH1 and TH2 (but not TH17) signatures, in particular because Nr4a directly represses the *Il4* locus [63]. Together, these alterations lead to a loss of Treg suppressive function in in vitro assays. Moreover, conditional ablation of the 3 receptors in total T cells almost leads to the complete absence of Treg cells and drives a Th2-mediated lethal autoimmune syndrome early after birth [62]. A similar phenotype was observed in mice with Treg-restricted ablation of all 3 receptors, while ablation of *Nr4a1* and 2 only, was not sufficient to induce disease [63]. These unstable Treg cells are also poor suppressors of anti-tumor immunity. Transplanted tumor growth is significantly reduced in *Nr4a1/2* double mutant animals, in a CD8-T-cell dependent fashion [64]. Importantly, single deletion of *Nr4a1* or *Nr4a2* is not sufficient to induce the phenotype, reinforcing the concept of major redundancy between Nr4a proteins. In this line, an in vitro screening assay revealed that the chemotherapeutic agent camptothecin, a topoisomerase inhibitor widely used in cancer care [65], is a potent inhibitor of Nr4a-induced transcription [64]. Its administration, either alone or with a Cyclooxygenase-2 (COX2) inhibitor, reduces tumor progression in syngeneic transplanted cancers, associated with reduced expression of Nr4a-dependent, Treg-associated genes and enhanced Tconv cell function. Finally, in addition to this effect on Treg cells, inhibition of Nr4a proteins also seems to salvage the dysfunctional state of exhausted anti-tumor T cells, bestowing cells with potent anti-tumor properties [66,67]. Thus, by affecting both Treg cells and exhausted Tconv cells, Nr4a proteins seem to be attractive targets in cancer therapy.

3.7. Bach2

Broad Complex-tramtrack-bric a brac and Cap'n'collar Homology 2 (Bach2) is a transcription factor of the Basic Leucine Zipper (bZip) family. Bach2 competes with Activator Protein-1 (AP-1) family members such as Jun and Fos and promotes the repression of AP-1 target genes, thereby restraining the terminal differentiation of CD8⁺ T cells and reducing *Il2* expression in CD4⁺ T cells [68,69]. Bach2 is also critical for the development and homeostasis of Treg cells. Its germline deletion drives systemic lethal autoimmunity in adult mice, associated with reduced Treg cells in the periphery [70,71]. Mechanistically, Bach2 was shown to prevent excessive activation of the rTreg pool by limiting the sensitivity to TCR signals, repressing aTreg-associated genes, and limiting cell apoptosis. For instance, Bach2 restricts the transcription of IRF4 target genes such as *Positive Regulatory Domain Containing 1, with zinc finger domain (Prdm1)* (encoding Blimp-1), allowing the long-term maintenance of rTreg cells and enabling their suppressive activity [72]. Bach2 expression is stabilized at the protein level by SUMO-specific Protease 3 (SEN3), which directly deSUMOylates Bach2 and prevents its nuclear export [73]. This central function has major implications in cancer immunity, since tumor growth is significantly delayed in *Bach2*-null mice transplanted with melanoma or thymoma cells, which is associated with reduced Treg cell accumulation in the tumor [74]. Similarly, conditional *Bach2* or *Senp3* ablation in Treg cells leads to enhanced anti-tumor immunity and delayed progression of transplanted colon cancer and melanoma, respectively, demonstrating a Treg-cell-intrinsic function of Bach2 in cancer [73,75].

3.8. E-Proteins and Their Inhibitor of DNA Binding (Id) Counterparts

E-proteins are transcriptional activators and repressors, the activity of which is inhibited by Id proteins. The E-proteins E2A and HEB inhibit the transition to the aTreg cell state [29]. Consequently, conditional ablation of *E2A* and *HEB* in mature Treg cells, leads to the accumulation of highly suppressive aTreg cells in the periphery [29]. Conversely, Treg-restricted deletion of *Id2* and *Id3* drives lethal autoimmunity in mice [76]. Paradoxically, forced expression of *Id2* in Treg cells enables mice to mount strong anti-tumor immune responses, with reduced melanoma growth and Treg cell numbers in the tumor bed [77]. This puzzling observation underlines the need for further analyses on the maintenance of the Treg pools through a balance between E-proteins and Id proteins.

3.9. STAT3

As the downstream signaling module of many cytokines and soluble factors, Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT3) appears to be an important regulator of Treg cell accumulation and function in cancer. Together with STAT5, STAT3 stabilizes *Foxp3* expression in response to IL-2 [78]; IL-23-driven STAT3 activation in tumor-infiltrating Treg cells achieves the same phenotype [79]. Furthermore, STAT3 and *Foxp3* co-operate to promote the suppression of Th17 immunity by Treg cells, as demonstrated by the TH17-mediated intestinal inflammation observed in mice with conditional ablation of *STAT3* in Treg cells [80]. Inhibition of Janus Kinase 2 (JAK2), which phosphorylates and activates STAT3, or STAT3 itself using a chemical inhibitor or antisense oligonucleotides, respectively, reduces the growth of transplanted tumors in mice, associated with decreased Treg cell frequencies [81,82]. However, it is unclear whether this therapeutic effect actually relies on Treg cell inhibition in these settings. Indeed STAT3 is involved in the differentiation and function of many other cell types, including TH17 cells that can be protective or deleterious in cancer, depending on the tumor type (reviewed in [83]). Therefore, additional studies are required to elucidate the cell-autonomous functions of STAT3 in Treg cells and other immune cells during cancer.

3.10. The NF- κ B Pathway

In the last few years, the NF- κ B pathway has emerged as a nexus regulator of Treg cell differentiation, gene expression, and function in autoimmunity and cancer. NF- κ B is a family of transcription factors composed of 5 subunits that associate as homo- or heterodimers and all share a Rel Homology Domain (RHD): NF- κ B1 (p105/p50, encoded by *Nfkb1*), RelA (encoded by *Rela*), and c-Rel (encoded by *Rel*) of the canonical pathway and NF- κ B2 (p100/p52, encoded by *Nfkb2*) and RelB (encoded by *Relb*) of the alternative pathway [84]. In T cells, the canonical pathway is classically activated by the engagement of the TCR and its CD28 partner. Briefly, TCR/CD28 triggering leads to the activation of Protein Kinase C, Isoform Theta (PKC θ). Activated PKC θ phosphorylates Caspase Recruitment domain-containing Membrane-Associated guanylate kinase protein-1 (Carma1), enabling the formation of the CBM complex composed of Carma1, B-cell lymphoma/leukemia 10 (Bcl10), and Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1 (Malt1). The CBM complex can then recruit the I κ B kinase (IKK) complex (composed of IKK α , β , and γ), which phosphorylates the Inhibitor of NF- κ B (I κ B) proteins to relieve inhibition of NF- κ B1, RelA, and c-Rel subunits, allowing their nuclear translocation. Both the canonical and the alternative pathway can also be activated by several members of the TNFRSF and CD28 families, in an activation mechanism that involves the TNFR-Associated Factor (TRAF) family of adaptors.

3.10.1. The Many Roles of NF- κ B in Treg Cells

The alternative NF- κ B pathway exhibits limited functions in Treg cell homeostasis. Conditional ablation of *Nfkb2*, but not *Relb*, in Treg cells, leads to a mild lymphoproliferation and colon inflammation [85]. *Nfkb2*-deficient Treg cells display a slight reduction in their suppressive function and are mostly characterized by an increased expression of TH17-associated genes, including *Il17a*.

In contrast, the canonical pathway is involved in many different aspects of Treg cell biology. The use of Treg-restricted conditional ablation of the canonical pathway intermediates and subunits has revealed the fundamental roles of NF- κ B in mature Treg cells in the periphery. Deletion of either *Carma1*, *Bcl10*, *Malt1*, *Ikkkb* (IKK β), or *Rela* leads to a lethal autoimmune syndrome [86–90]. Interestingly, *Rel* mutant mice display a milder, non-lethal inflammatory syndrome that only arises from >20 weeks of age [90]. This indicates a selective and differential contribution of each NF- κ B subunit in the maintenance of peripheral Treg cell homeostasis.

Importantly, these critical functions have a major impact in the context of cancer. Transplanted melanoma growth is dramatically impaired in mice carrying a germline ablation or a Treg-restricted ablation of *Rel*, but not *Rela* [26]. Similar results were obtained when using conditional ablation of *Carma1*, *Bcl10*, and *Malt1* and transplanted models of melanoma, thymoma, or colon adenocarcinoma [86,88,89]. Mechanistically, CBM- and *Rel*-deficient Treg cells exhibit impaired expression of a Treg-associated genes and accumulation in tumor tissues, while significantly increasing their expression of Tconv-associated markers, in particular IFN γ . This even leads to a dominant, Treg-cell-intrinsic anti-tumor function, as the sole transfer of *Carma1*-deficient Treg cells into immunocompetent recipients, is sufficient to reduce tumor growth in an IFN γ -dependent manner [86]. Of note, the transcriptional program of c-Rel- and *Carma1*-deficient Treg cells does not fully overlap. Moreover, the expression of an IKK β^{CA} transgene, that leads to the constitutive activation of p50 and RelA (but not c-Rel, personal communication) fails to rescue the autoimmune syndrome in *Carma1* and *Bcl10* mutant animals [86,89]. It is therefore possible that the function of the CBM complex, in this setting, may partially rely on NF- κ B-independent functions.

These observations have led to the use of CBM, IKK β , and c-Rel inhibitors as therapeutic agents in preclinical models of cancer, with encouraging observations. Administration of the *Malt1* inhibitors mepazine or MI-2 significantly delays tumor growth when injected in a curative schedule, alone or in combination with a tumor vaccine. The drug also sensitizes checkpoint-blockade-resistant tumors to anti-PD-1 therapy [86,89]. Interestingly, mepazine was proposed to exert its anti-cancer properties through the inhibition of c-Rel in human pancreatic cancer xenografts [91]. Consistently, prolonged systemic inhibition of IKK β by the Kinase Inhibitor of NF- κ B-1 (KINK-1) agent, though ineffective when administered alone, potentiates the anti-cancer effect of a tumor vaccine in transplanted melanoma [87]. Another well-known, though poorly selective, IKK inhibitor, curcumin, decreases the number of intra-tumoral Treg cells in preclinical models of cancer [92–94], and enhances Th1 cells, while decreasing Treg cells in patients with lung and colon cancer [95,96]. Finally, c-Rel inhibition using the methylxanthine derivative Pentoxifylline (PTXF) or the selective c-Rel inhibitors, IT-603 or R96A, significantly reduces tumor growth and synergizes with anti-PD-1/Programmed cell Death Ligand 1 (PD-L1) therapy as well as doxorubicin [26,97–99]. Interestingly, it seems that most of these drugs, in particular mepazine and PTXF, act through the destabilization of tumor-infiltrating Treg cells by inducing their expression of effector cytokines, rather than by depleting the cells or directly perturbing their inhibitory program.

3.10.2. NF- κ B Is a Nexus Regulator of the Treg Cell Transcriptional Program in Cancer

In addition to these observations, it is interesting to note that not only does NF- κ B directly control many Treg-hallmark genes [90], but it also drives the expression of other transcription factors and epigenetic regulators involved in the suppression of cancer immunity by Treg cells (Figure 2). For instance, NF- κ B controls the expression of *Ikzf2* and *Ikzf4* in a RelA- and c-Rel-dependent manner. *Enhancer of Zeste Homolog 2* (*Ezh2*), whose function will be detailed below, is a c-Rel-dependent gene in T cells [100]. Similarly, expression of *Bach2* and *Irf4* is lost in c-Rel-deficient B cells [101,102], though similar observations are currently lacking for T cells.

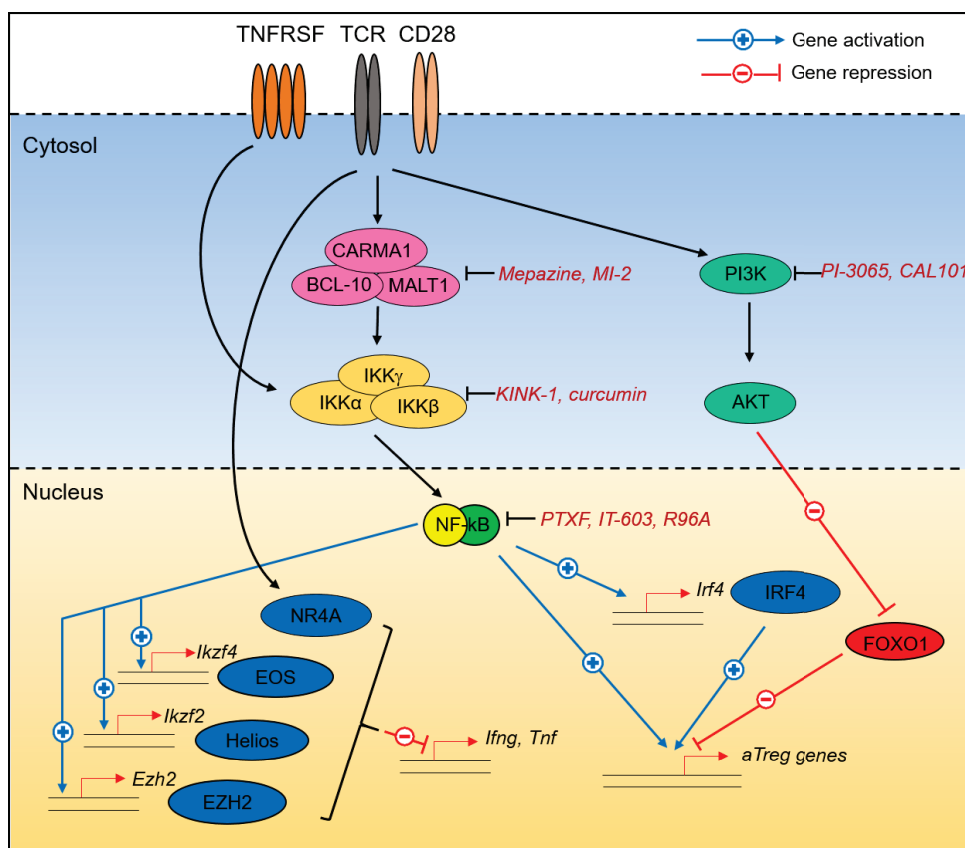


Figure 2. Molecular programming of Treg cells in cancer. Different pathways and transcription factors converge to maintain Treg cell identity in tumors, i.e., the expression of Activated Treg cells (aTreg)-signature genes and the inhibition of inflammatory cytokine expression. Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), through its regulation of downstream targets, occupies a central place in this program. A number of chemicals, natural products, and small-molecule inhibitors with potent anti-tumor properties are also highlighted.

Collectively, canonical NF- κ B and its upstream canonical pathway are of utmost interest for cancer therapy. Of course, owing to the crucial role of NF- κ B in cancer initiation, progression, and dissemination [103], many attempts have been made to introduce NF- κ B inhibitors into clinics [104]. However, the numerous adverse effects of these inhibitors originally tested in patients have eventually discouraged this research [105]. For further developments in this field, it is thus important to keep in mind that the specificity and safety of such drugs is mandatory for their clinical application. In light of our recent reports demonstrating a selective contribution of each NF- κ B subunit to different aspects of Treg cell biology, an attractive option may be to specifically inhibit c-Rel instead of targeting general upstream regulators. No severe adverse effects of the c-Rel inhibitor PTXF (commercialized as Trental) were reported when administered to humans [106]. The recent description of potent and apparently safe c-Rel inhibitors further advocates for such a use [97,99].

4. Epigenetic Programming of Treg Cells in Cancer

In addition to the regulation of Treg cell biology by transcription factors, their identity is also linked to the activity of a number of epigenetic regulators, with implications for their targeting in cancer.

Among these regulators, the histone methyltransferase EZH2, is a prime determinant of Treg activity. As part of the Polycomb Repressive 2 (PRC2) complex, EZH2 represses gene transcription through the addition of H3K27^{3me} marks. Importantly, in T cells, *Ezh2* expression is enhanced by CD28 signaling, in a c-Rel-dependent manner [100]. Foxp3 and EZH2 have been shown to co-localize on

Treg-associated gene loci, providing a possible mechanism for the repressive activity of Foxp3 [107]. Conditional ablation of *Ezh2* in Foxp3⁺ cells drives a spontaneous lethal inflammatory syndrome linked to Treg cell instability. Moreover, *Ezh2*-deficient naïve T cells display an impaired ability to form Foxp3⁺ iTreg cells in vitro [108,109]. In addition, these unstable Treg cells are poor suppressors of anti-tumor responses, as conditional knock-out (KO) animals show impaired growth of transplanted melanoma colon, prostate, and bladder tumors, associated with enhanced T-cell infiltration and function in the tumor microenvironment [110,111]. Conversely, Treg-restricted ablation of the H3K27 demethylase Jumanji domain-containing protein D3 (*Jmjd3*), increases tumor growth [110]. This set of data is of particular interest, as the efficacy of small-molecule inhibitors of EZH2 for the treatment of cancer is currently under investigation [112]. In support of such strategies, EZH2 inhibitors reduce tumor progression and synergize with anti-CTLA4 therapy in a T-cell-dependent fashion [111,113]. Another layer of epigenetic regulation is the critical role of Histone Deacetylases (HDACs) in Treg cell identity. Four different classes of HDACs are known to repress gene expression and protein stability in various ways and can therefore be either beneficial or deleterious for Treg cells [114]. The class I HDAC inhibitor Entinostat, currently under investigation in different types of cancer, was shown to decrease *Foxp3* expression in vitro and in vivo [115]. Similarly, chemical inhibition or genetic ablation of REST Corepressor 1 (*Rcor 1*) in Treg cells that leads to disruption of HDAC1 and HDAC2 activity, promotes the expression of inflammatory cytokines by Treg cells, and impairs their ability to suppress anti-tumor immunity [116]. Finally, it was shown that genetic ablation of the histone/protein acetyltransferase *p300* specifically in Treg cells, delays the growth of transplanted tumors, while autoimmune symptoms remain mild and non-lethal [117].

Together, these studies argue in favor of the importance of epigenetic regulation in Treg cells during cancer. It is interesting to note that many of the inhibitors tested in the above studies do not seem to affect anti-tumor Tconv cells, revealing Treg-cell-specific requirements for EZH2 or p300 in Treg genome architecture and gene expression. Because many epigenetic modulators are currently tested in the clinics [118], this provides an additional rationale for their use as Treg-cell-targeting agents in cancer immunotherapy.

5. Shared Mechanisms of Treg Cell Reprogramming in Cancer

It can appear surprising that so many individual transcription factors and pathways exhibit non-redundant functions in Treg cells during cancer. One explanation may reside in the following common observation: whereas the number of Treg cells and/or their function remains generally intact or only slightly impacted, their stability and their “identity” is largely impaired. Specifically, the conversion of rTreg into aTreg and/or the stability of the aTreg subset is deeply affected by ablating the CBM/NF- κ B axis or upon constitutive activation of Foxo1 [26,30,86]. More interestingly, discrete alterations in transcription factors and upstream signals lead to a common increase in the expression of major inflammatory cytokines. Specifically, *Carma1*, *Rel*, *Nrp1*, *Ezh2*, *Senp3*, and *Irf2*-null Treg all produce appreciable amounts of IFN γ and/or TNF in the tumor microenvironment [26,43,53,73,86,110] (Figure 2). This transformation into anti-tumor cells was nicely demonstrated with *Carma1*-deficient Treg cells, the transfer of which was sufficient to delay tumor growth in recipient animals [86]. Hence, this highlights Treg “reprogramming” as a relevant and dominant approach to improve anti-tumor immunity [119].

6. Challenges on the Path toward Cancer Therapy

We have now at our disposal an exhaustive list of transcription factors involved in Treg-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. Although this highlights many possible molecular targets, there are still a number of challenges that must be considered if we are to apply these discoveries to cancer therapy.

6.1. Missing Pieces of the Puzzle

Despite the extensive and thorough knowledge on Treg cell regulation in cancers described above, this obviously remains incomplete. It is likely that other transcriptional regulators will be described in the near future as important for tumor immunosuppression and as putative therapeutic targets. The specific function in cancer, of many master regulators of Treg cell identity and differentiation, has not yet been investigated. For example, the Interleukin-2 (IL-2)/Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) axis is critical for Treg cell differentiation and function [120,121], but its role in cancer has not been formally evaluated yet. Downstream of the TCR/CD28 signaling, NFAT is integral for the transcriptional landscape of Treg cells [122]. AP-1 transcription factors, in particular JunB, seem to be involved in the specification of aTreg cells [28]. Similarly, the role of Blimp1, a central hub of aTreg cell identity, remains unknown in cancer immunity [123].

It is important to note that many of the studies described in the above sections, used the Foxp3^{cre} mouse strain as a model to investigate Treg cell autonomous functions of given genes. In recent years, it has been largely demonstrated that expression of Cre recombinase can occur in Foxp3⁻ non-Treg cells. This stochastic activity of the *Foxp3* promoter—and “leaky” expression of the Foxp3^{cre} allele—may lead to recombination of the loxP-flanked regions in other immune cells that are involved in cancer immunity, such as CD4⁺ Tconv, CD8⁺ T cells, and also myeloid cell subsets [124–126]. Therefore, it would be of the greatest interest to reevaluate some of the functions that were attributed to the sole activity of transcription factors in Treg cells. Different models can be proposed and are already in use: the Foxp3^{cre-ert2} strain that allows tamoxifen-inducible ablation of floxed genes, which limits the duration of Cre activity [127]; the comparison of results obtained with Foxp3^{cre} and other strains such as CD4^{cre} or germline ablations; or the reconstitution of immunodeficient mice with wild-type and mutant immune cell subsets.

In addition, our knowledge will undoubtedly be improved by the implementation of large-scale screening technologies. For instance, three recent studies have used genome-wide and pooled Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) screen approaches, to identify unknown elements involved in the maintenance of Foxp3 expression and Treg cell identity both in murine and human cells [128–130]. These reports have highlighted a series of novel pathways, such as ubiquitin ligases and deubiquitinases, chromatin remodelers, and transcription factors; in particular, Loo et al. nicely demonstrated that ablation of the *Bromodomain-containing protein 9* (*Brd9*) subunit of the non-canonical BRG1/BRM Associated Factors (BAF) complex, impaired *Foxp3* expression and reduced Treg cell function, leading to enhanced tumor immunity and delayed growth of transplanted MC38 colon adenocarcinoma cells [129]. The quantity of data brought by modern technologies such as CRISPR screens will be invaluable for the discovery of unique or shared molecules that can be targeted to impair Treg cells specifically in tumors.

6.2. Avoiding Autoimmunity

Immune-related adverse events, in particular autoimmunity, are among the main complications of the checkpoint-blockade cancer therapies anti-CTLA-4 and anti-PD-1. In patients, CTLA-4 blockade often leads to severe autoimmune symptoms, in particular colitis. Although PD-1/PD-L1 blockade generally induces milder complications, thyroiditis is a frequent complication [131]. Mechanistically, there are commonalities between the two treatments: both the engagement of CTLA-4 and PD-1 drive the recruitment of the phosphatase SHP-2 (Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-2) (and PP2A (Protein Phosphatase 2A) for CTLA-4), leading to impaired activation of the TCR/CD28 cascade through PI3K, MAPK, AP-1, and NF-κB [132,133]. Inhibition of either receptor leads to enhance activation of the aforementioned pathways [133–135], which might thus be responsible for the autoimmune symptoms. It is therefore of the utmost interest to understand the role of these signaling cascades both in Treg and Tconv cells.

In addition, these symptoms are likely due to the stimulation of T cells not only at the tumor site but also in peripheral tissues. An important step in the development of safe therapeutics would,

therefore, be to identify targets that are restricted to the cancer microenvironment. It is noticeable that in many instances, the same pathway or transcription factor can be involved in Treg cell function both in the settings of cancer and tolerance to self. As described in Table 1, Treg-specific ablation of a single gene can lead to pronounced autoimmune symptoms. In contrast, mice with conditional ablation of *Ikzf2*, *Pten*, *Rcor 1*, or *Rel*, for instance, display no (or limited) signs of autoimmunity while enabling enhanced tumor clearance, perhaps indicating “safer” therapeutic targets in terms of adverse effects.

Table 1. Autoimmune symptoms in mice with enhanced anti-tumor immunity. Models are ranked by severity of the syndrome.

Protein/Family	Mouse Model	Autoimmune Symptoms	Lethality	Ref.
IKK β	Foxp3 ^{cre} Ikkkb ^{F/F}	Scurfy-like syndrome	Yes	[87]
Ezh2	Foxp3 ^{cre} Ezh2 ^{F/F}	From 1 month of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	Yes	[108]
IRF4	Foxp3 ^{cre} Irf4 ^{F/F}	From 6 to 8 weeks of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	Yes	[38]
Id proteins	Foxp3 ^{cre} Id2 ^{Tg}	From 6 to 8 weeks of age, progressive T conv cell activation and tissue infiltration	Yes	[77]
STAT3	Foxp3 ^{cre} Stat3 ^{F/F}	From 6 to 8 weeks of age, splenomegaly and colon inflammation	Yes	[80]
Bach2	Bach2 ^{-/-}	From 3 months of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	Yes	[70]
P300	Foxp3 ^{cre} ep300 ^{F/F}	From 10 weeks of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	n.d.	[117]
CBM complex	Foxp3 ^{cre} Bcl10 ^{F/F}	Scurfy-like syndrome	Yes	[89]
	Foxp3 ^{cre} Malt1 ^{F/C4712A}	from 6 to 8 weeks of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	n.d.	[88]
	Foxp3 ^{cre/+} Carma1 ^{F/F}	No detectable signs of autoimmunity (Foxp3 ^{cre/cre} Carma1 ^{F/F} develop Scurfy-like syndrome)	No	[86]
NF- κ B	Foxp3 ^{cre} Rel ^{F/F}	Mild lymphoproliferation from 20 weeks of age	No	[90]
Helios	Foxp3 ^{cre} Ikzf2 ^{F/F}	From 5 months of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	No	[52]
Foxo1	Foxp3 ^{cre} Foxo1 ^{CA/+}	No detectable signs of autoimmunity (Foxo1 ^{CA/CA} develop lethal autoimmunity)	No	[30]
Pten	Foxp3 ^{cre} PTEN ^{F/F}	From 12 weeks of age, spontaneous T conv cell activation, kidney damage	No	[136]
	Foxp3 ^{cre} PTEN ^{F/F} (2nd construct)	No detectable signs of autoimmunity	No	[41]
Nr4a	Foxp3 ^{cre} Nr4a1 ^{F/F} Nr4a2 ^{F/F} dKO	No detectable signs of autoimmunity (Nr4a1/3 dKO and Nr4a1/2/3 tKO develop lethal autoimmunity)	No	[63]
PI3K	Foxp3 ^{cre} p110d ^{F/F}	No detectable signs of autoimmunity	No	[44]

n.d.: not described; dKO: double knock-out; tKO: triple knock-out.

6.3. The Issue of Multiple Cell Type Targeting with a Single Agent

The vast majority of the studies described in Section 3 have used Treg-cell-restricted deletion of gene(s) as models. However, it is obvious that many of these transcription factors and regulators also are expressed by other cell types and may impact their function. To ensure the specificity and potency of novel therapeutics, we should at some point obtain a global view of the molecular regulation of the tumor microenvironment as a whole, i.e., assess the potential role of these pathways in other immune cells, as well as in tumor and stromal cells. In some cases, small-molecule inhibitors may impair the fitness of both Treg cells and tumor cells, thus exhibiting a double beneficial effect to restrict cancer progression. This is clearly illustrated, for the various inhibitors of the NF- κ B pathway described above. Indeed, in addition to their effect on Treg cell stability, mepazine, KINK-1, or PTXF have all been shown to directly impair tumor cell proliferation, gene expression, and invasiveness [137–141]. However, it is important to keep in mind that signaling pathways and transcription factors can also be expressed and required by anti-tumor immune cells, such as Tconv cells. Once again, this is the case for NF- κ B, well-described as a critical component of Tconv cell function in many settings, including cancer [142–145]. This need for a global delineation of the different players is further illustrated by the importance of the balance between Treg and Th17 cells in many cancer types [146]. Indeed, it appears that the same pathways and transcription factors (e.g., STAT3, NF- κ B, or Notch) can be involved in the differentiation and function of both subsets. Thereby, important work remains to be done to dissect the different cell types and mechanisms that can be triggered or targeted by a single agent. This could lead to the use of Treg-cell-directed compounds, for instance, using antibody–drug conjugates that are currently under development [145].

6.4. Mouse and Human Treg Cells: Commonalities and Divergences

Mechanistic understanding of the pathways involved in the suppression of tumor immunity by Treg cells has required the use of mouse models. These have enabled the discovery of a myriad therapeutic targets. Nevertheless, it is now essential to compare the expression of transcription factors in murine and human Treg cells and to investigate whether these proteins exhibit similar or divergent functions. This need is exemplified by the absence of consensus on the phenotype of human Treg cells. For instance, FOXP3 can also be expressed by a subset of effector T cells [35,36]. In addition, even the function of human Treg cells in promoting tumor growth is controversial or at least is dependent on the type of cancer [9].

7. Conclusions

Different strategies can be considered to impair Treg cell “fitness” in cancers. Protocols aiming at impairing their numbers (recruitment, expansion, survival, etc.) or their suppressive function (CTLA-4, inhibitory cytokines, etc.) are under extensive investigation. The amount of literature described above now suggests that by modulating the transcriptional profile of Treg cells, their potential instability can be exploited in a therapeutic manner. Indeed, instead of depleting Treg cells, strategies aiming at reprogramming Treg cells into anti-tumor cells deserve further development. It may seem optimistic to find the “perfect” mechanism, i.e., a targetable pathway or transcription factor selectively involved in human Treg (but not Tconv) cells, specifically in the tumor (but not normal tissues). However, novel technologies, such as single-cell sequencing and CRISPR/Cas9 approaches, should help unravel fundamental mechanisms in the biology of human Treg cells in cancer, and thus provide a strong rationale for the use of modulators of the transcriptional process for cancer therapy.

Author Contributions: Conceptualization, Y.G.-B.; writing—original draft preparation, Y.G.-B.; writing—review and editing, P.S., R.L., and A.V.; funding acquisition, Y.G.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from INSERM/CNRS ATIP-Avenir and the Labex DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061). P.S. is funded by the Federation pour la Recherche Médicale, A.V. has a postdoctoral fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer.

Acknowledgments: The authors are grateful to Guilhem Lalle, Julie Twardowski, and Brigitte Manship for their critical reading of the manuscript and helpful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **2008**, *133*, 775–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Godfrey, V.L.; Wilkinson, J.E.; Russell, L.B. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 1379–1387. [[PubMed](#)]
3. Bennett, C.L.; Christie, J.; Ramsdell, F.; Brunkow, M.E.; Ferguson, P.J.; Whitesell, L.; Kelly, T.E.; Saulsbury, F.T.; Chance, P.F.; Ochs, H.D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 20–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kim, J.M.; Rasmussen, J.P.; Rudensky, A.Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 191–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lahl, K.; Loddenkemper, C.; Drouin, C.; Freyer, J.; Arnason, J.; Eberl, G.; Hamann, A.; Wagner, H.; Huehn, J.; Sparwasser, T. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vignali, D.A.; Collison, L.W.; Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 523–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Onizuka, S.; Tawara, I.; Shimizu, J.; Sakaguchi, S.; Fujita, T.; Nakayama, E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 3128–3133.
8. Nishikawa, H.; Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 759–767. [[CrossRef](#)]
9. Whiteside, T.L. FOXP3+ Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity. *Expert Opin. Ther. Targets* **2018**, *22*, 353–363. [[CrossRef](#)]
10. Simpson, T.R.; Li, F.; Montalvo-Ortiz, W.; Sepulveda, M.A.; Bergerhoff, K.; Arce, F.; Roddie, C.; Henry, J.Y.; Yagita, H.; Wolchok, J.D.; et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 1695–1710. [[CrossRef](#)]
11. Arce Vargas, F.; Furness, A.J.S.; Litchfield, K.; Joshi, K.; Rosenthal, R.; Ghorani, E.; Solomon, I.; Lesko, M.H.; Ruef, N.; Roddie, C.; et al. Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 649–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sharma, A.; Subudhi, S.K.; Blando, J.; Vence, L.; Wargo, J.; Allison, J.P.; Ribas, A.; Sharma, P. Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3(+) Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers-Response. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3469–3470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cai, J.; Wang, D.; Zhang, G.; Guo, X. The Role Of PD-1/PD-L1 Axis in Treg Development and Function: Implications for Cancer Immunotherapy. *Onco. Targets Ther.* **2019**, *12*, 8437–8445. [[CrossRef](#)]
14. Kamada, T.; Togashi, Y.; Tay, C.; Ha, D.; Sasaki, A.; Nakamura, Y.; Sato, E.; Fukuoka, S.; Tada, Y.; Tanaka, A.; et al. PD-1(+) regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 9999–10008. [[CrossRef](#)]
15. Lee, W.; Lee, G.R. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, e456. [[CrossRef](#)]
16. Savage, P.A.; Klawon, D.E.J.; Miller, C.H. Regulatory T Cell Development. *Annu. Rev. Immunol.* **2020**, *38*, 421–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Koizumi, S.I.; Ishikawa, H. Transcriptional Regulation of Differentiation and Functions of Effector T Regulatory Cells. *Cells* **2019**, *8*, 939. [[CrossRef](#)]
18. Plitas, G.; Konopacki, C.; Wu, K.; Bos, P.D.; Morrow, M.; Putintseva, E.V.; Chudakov, D.M.; Rudensky, A.Y. Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity* **2016**, *45*, 1122–1134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. De Simone, M.; Arrighoni, A.; Rossetti, G.; Gruarin, P.; Ranzani, V.; Politano, C.; Bonnal, R.J.P.; Provasi, E.; Sarnicola, M.L.; Panzeri, I.; et al. Transcriptional Landscape of Human Tissue Lymphocytes Unveils Uniqueness of Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *Immunity* **2016**, *45*, 1135–1147. [[CrossRef](#)]

20. Rudensky, A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol. Rev.* **2011**, *241*, 260–268. [[CrossRef](#)]
21. Samstein, R.M.; Arvey, A.; Josefowicz, S.Z.; Peng, X.; Reynolds, A.; Sandstrom, R.; Neph, S.; Sabo, P.; Kim, J.M.; Liao, W.; et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* **2012**, *151*, 153–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rudra, D.; deRoos, P.; Chaudhry, A.; Niec, R.E.; Arvey, A.; Samstein, R.M.; Leslie, C.; Shaffer, S.A.; Goodlett, D.R.; Rudensky, A.Y. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 1010–1019. [[CrossRef](#)]
23. Kwon, H.K.; Chen, H.M.; Mathis, D.; Benoist, C. Different molecular complexes that mediate transcriptional induction and repression by FoxP3. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 1238–1248. [[CrossRef](#)]
24. Cretney, E.; Xin, A.; Shi, W.; Minnich, M.; Masson, F.; Miasari, M.; Belz, G.T.; Smyth, G.K.; Busslinger, M.; Nutt, S.L.; et al. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 304–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dias, S.; D’Amico, A.; Cretney, E.; Liao, Y.; Tellier, J.; Bruggeman, C.; Almeida, F.F.; Leahy, J.; Belz, G.T.; Smyth, G.K.; et al. Effector Regulatory T Cell Differentiation and Immune Homeostasis Depend on the Transcription Factor Myb. *Immunity* **2017**, *46*, 78–91. [[CrossRef](#)]
26. Grinberg-Bleyer, Y.; Oh, H.; Desrichard, A.; Bhatt, D.M.; Caron, R.; Chan, T.A.; Schmid, R.M.; Klein, U.; Hayden, M.S.; Ghosh, S. NF-kappaB c-Rel Is Crucial for the Regulatory T Cell Immune Checkpoint in Cancer. *Cell* **2017**, *170*, 1096–1108.e13. [[CrossRef](#)]
27. Vasanthakumar, A.; Liao, Y.; Teh, P.; Pascutti, M.F.; Oja, A.E.; Garnham, A.L.; Gloury, R.; Tempany, J.C.; Sidwell, T.; Cuadrado, E.; et al. The TNF Receptor Superfamily-NF-kappaB Axis Is Critical to Maintain Effector Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 2906–2920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Koizumi, S.I.; Sasaki, D.; Hsieh, T.H.; Taira, N.; Arakaki, N.; Yamasaki, S.; Wang, K.; Sarkar, S.; Shirahata, H.; Miyagi, M.; et al. JunB regulates homeostasis and suppressive functions of effector regulatory T cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Han, X.; Huang, H.; Gao, P.; Zhang, Q.; Liu, X.; Jia, B.; Strober, W.; Hou, B.; Zhou, X.; Gao, G.F.; et al. E-protein regulatory network links TCR signaling to effector Treg cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 4471–4480. [[CrossRef](#)]
30. Luo, C.T.; Liao, W.; Dadi, S.; Toure, A.; Li, M.O. Graded Foxo1 activity in Treg cells differentiates tumour immunity from spontaneous autoimmunity. *Nature* **2016**, *529*, 532–536. [[CrossRef](#)]
31. Wang, K.; Fu, W. Transcriptional regulation of Treg homeostasis and functional specification. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 4269–4287. [[CrossRef](#)]
32. Casares, N.; Rudilla, F.; Arribillaga, L.; Llopiz, D.; Riezu-Boj, J.I.; Lozano, T.; Lopez-Sagaseta, J.; Guembe, L.; Sarobe, P.; Prieto, J.; et al. A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 5150–5159. [[CrossRef](#)]
33. Lozano, T.; Villanueva, L.; Durantez, M.; Gorraiz, M.; Ruiz, M.; Belsue, V.; Riezu-Boj, J.I.; Hervas-Stubbs, S.; Oyarzabal, J.; Bandukwala, H.; et al. Inhibition of FOXP3/NFAT Interaction Enhances T Cell Function after TCR Stimulation. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 3180–3189. [[CrossRef](#)]
34. Lozano, T.; Gorraiz, M.; Lasarte-Cia, A.; Ruiz, M.; Rabal, O.; Oyarzabal, J.; Hervas-Stubbs, S.; Llopiz, D.; Sarobe, P.; Prieto, J.; et al. Blockage of FOXP3 transcription factor dimerization and FOXP3/AML1 interaction inhibits T regulatory cell activity: Sequence optimization of a peptide inhibitor. *Oncotarget* **2017**, *8*, 71709–71724. [[CrossRef](#)]
35. Wang, J.; Ioan-Facsinay, A.; van der Voort, E.I.; Huizinga, T.W.; Toes, R.E. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 129–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Miyara, M.; Yoshioka, Y.; Kitoh, A.; Shima, T.; Wing, K.; Niwa, A.; Parizot, C.; Taflin, C.; Heike, T.; Valeyre, D.; et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **2009**, *30*, 899–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Huber, M.; Lohoff, M. IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. *Eur. J. Immunol.* **2014**, *44*, 1886–1895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zheng, Y.; Chaudhry, A.; Kas, A.; deRoos, P.; Kim, J.M.; Chu, T.T.; Corcoran, L.; Treuting, P.; Klein, U.; Rudensky, A.Y. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* **2009**, *458*, 351–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Alvisi, G.; Brummelman, J.; Puccio, S.; Mazza, E.M.; Tomada, E.P.; Losurdo, A.; Zanon, V.; Peano, C.; Colombo, F.S.; Scarpa, A.; et al. IRF4 instructs effector Treg differentiation and immune suppression in human cancer. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 3137–3150. [[CrossRef](#)]
40. Man, K.; Gabriel, S.S.; Liao, Y.; Gloury, R.; Preston, S.; Henstridge, D.C.; Pellegrini, M.; Zehn, D.; Berberich-Siebelt, F.; Febbraio, M.A.; et al. Transcription Factor IRF4 Promotes CD8(+) T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **2017**, *47*, 1129–1141.e5. [[CrossRef](#)]
41. Sharma, M.D.; Shinde, R.; McGaha, T.L.; Huang, L.; Holmgaard, R.B.; Wolchok, J.D.; Mautino, M.R.; Celis, E.; Sharpe, A.H.; Francisco, L.M.; et al. The PTEN pathway in Tregs is a critical driver of the suppressive tumor microenvironment. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Delgoffe, G.M.; Woo, S.R.; Turnis, M.E.; Gravano, D.M.; Guy, C.; Overacre, A.E.; Bettini, M.L.; Vogel, P.; Finkelstein, D.; Bonnevier, J.; et al. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* **2013**, *501*, 252–256. [[CrossRef](#)]
43. Overacre-Delgoffe, A.E.; Chikina, M.; Dadey, R.E.; Yano, H.; Brunazzi, E.A.; Shayan, G.; Horne, W.; Moskovitz, J.M.; Kolls, J.K.; Sander, C.; et al. Interferon-gamma Drives Treg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell* **2017**, *169*, 1130–1141.e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ali, K.; Soond, D.R.; Pineiro, R.; Hagemann, T.; Pearce, W.; Lim, E.L.; Bouabe, H.; Scudamore, C.L.; Hancox, T.; Maecker, H.; et al. Inactivation of PI(3)K p110delta breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. *Nature* **2014**, *510*, 407–411. [[CrossRef](#)]
45. Lim, E.L.; Cugliandolo, F.M.; Rosner, D.R.; Gyori, D.; Roychoudhuri, R.; Okkenhaug, K. Phosphoinositide 3-kinase delta inhibition promotes antitumor responses but antagonizes checkpoint inhibitors. *JCI Insight* **2018**, *3*, e120626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Abu-Eid, R.; Samara, R.N.; Ozbun, L.; Abdalla, M.Y.; Berzofsky, J.A.; Friedman, K.M.; Mkrtichyan, M.; Khleif, S.N. Selective inhibition of regulatory T cells by targeting the PI3K-Akt pathway. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 1080–1089. [[CrossRef](#)]
47. Chellappa, S.; Kushekhar, K.; Munthe, L.A.; Tjonnfjord, G.E.; Aandahl, E.M.; Okkenhaug, K.; Tasken, K. The PI3K p110delta Isoform Inhibitor Idelalisib Preferentially Inhibits Human Regulatory T Cell Function. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 1397–1405. [[CrossRef](#)]
48. Ouyang, W.; Liao, W.; Luo, C.T.; Yin, N.; Huse, M.; Kim, M.V.; Peng, M.; Chan, P.; Ma, Q.; Mo, Y.; et al. Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature* **2012**, *491*, 554–559. [[CrossRef](#)]
49. Kim, H.J.; Barnitz, R.A.; Kreslavsky, T.; Brown, F.D.; Moffett, H.; Lemieux, M.E.; Kaygusuz, Y.; Meissner, T.; Holderried, T.A.; Chan, S.; et al. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science* **2015**, *350*, 334–339. [[CrossRef](#)]
50. Thornton, A.M.; Korty, P.E.; Tran, D.Q.; Wohlfert, E.A.; Murray, P.E.; Belkaid, Y.; Shevach, E.M. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 3433–3441. [[CrossRef](#)]
51. Gottschalk, R.A.; Corse, E.; Allison, J.P. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 976–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Sebastian, M.; Lopez-Ocasio, M.; Metidji, A.; Rieder, S.A.; Shevach, E.M.; Thornton, A.M. Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 144–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Nakagawa, H.; Sido, J.M.; Reyes, E.E.; Kiers, V.; Cantor, H.; Kim, H.J. Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 6248–6253. [[CrossRef](#)]
54. Yates, K.; Bi, K.; Haining, W.N.; Cantor, H.; Kim, H.J. Comparative transcriptome analysis reveals distinct genetic modules associated with Helios expression in intratumoral regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 2162–2167. [[CrossRef](#)]
55. Li, X.; Li, D.; Huang, X.; Zhou, P.; Shi, Q.; Zhang, B.; Ju, X. Helios expression in regulatory T cells promotes immunosuppression, angiogenesis and the growth of leukemia cells in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* **2018**, *67*, 60–66. [[CrossRef](#)]
56. Cai, Q.; Dierich, A.; Oulad-Abdelghani, M.; Chan, S.; Kastner, P. Helios deficiency has minimal impact on T cell development and function. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 2303–2311. [[CrossRef](#)]

57. Pan, F.; Yu, H.; Dang, E.V.; Barbi, J.; Pan, X.; Grosso, J.F.; Jinasena, D.; Sharma, S.M.; McCadden, E.M.; Getnet, D.; et al. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science* **2009**, *325*, 1142–1146. [[CrossRef](#)]
58. Rieder, S.A.; Metidji, A.; Glass, D.D.; Thornton, A.M.; Ikeda, T.; Morgan, B.A.; Shevach, E.M. Eos Is Redundant for Regulatory T Cell Function but Plays an Important Role in IL-2 and Th17 Production by CD4+ Conventional T Cells. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 553–563. [[CrossRef](#)]
59. Gokhale, A.S.; Gangaplara, A.; Lopez-Occasio, M.; Thornton, A.M.; Shevach, E.M. Selective deletion of Eos (Ikzf4) in T-regulatory cells leads to loss of suppressive function and development of systemic autoimmunity. *J. Autoimmun.* **2019**, *105*, 102300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Moran, A.E.; Holzapfel, K.L.; Xing, Y.; Cunningham, N.R.; Maltzman, J.S.; Punt, J.; Hogquist, K.A. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 1279–1289. [[CrossRef](#)]
61. Sekiya, T.; Kashiwagi, I.; Inoue, N.; Morita, R.; Hori, S.; Waldmann, H.; Rudensky, A.Y.; Ichinose, H.; Metzger, D.; Chambon, P.; et al. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Sekiya, T.; Kashiwagi, I.; Yoshida, R.; Fukaya, T.; Morita, R.; Kimura, A.; Ichinose, H.; Metzger, D.; Chambon, P.; Yoshimura, A. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 230–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sekiya, T.; Kondo, T.; Shichita, T.; Morita, R.; Ichinose, H.; Yoshimura, A. Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature T reg cells. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 1623–1640. [[CrossRef](#)]
64. Hibino, S.; Chikuma, S.; Kondo, T.; Ito, M.; Nakatsukasa, H.; Omata-Mise, S.; Yoshimura, A. Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 3027–3040. [[CrossRef](#)]
65. Venditto, V.J.; Simanek, E.E. Cancer therapies utilizing the camptothecins: A review of the in vivo literature. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 307–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Chen, J.; Lopez-Moyado, I.F.; Seo, H.; Lio, C.J.; Hempleman, L.J.; Sekiya, T.; Yoshimura, A.; Scott-Browne, J.P.; Rao, A. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature* **2019**, *567*, 530–534. [[CrossRef](#)]
67. Liu, X.; Wang, Y.; Lu, H.; Li, J.; Yan, X.; Xiao, M.; Hao, J.; Alekseev, A.; Khong, H.; Chen, T.; et al. Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature* **2019**, *567*, 525–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Roychoudhuri, R.; Clever, D.; Li, P.; Wakabayashi, Y.; Quinn, K.M.; Klebanoff, C.A.; Ji, Y.; Sukumar, M.; Eil, R.L.; Yu, Z.; et al. BACH2 regulates CD8(+) T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 851–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Jang, E.; Lee, H.R.; Lee, G.H.; Oh, A.R.; Cha, J.Y.; Igarashi, K.; Youn, J. Bach2 represses the AP-1-driven induction of interleukin-2 gene transcription in CD4 T cells. *BMB Rep.* **2017**, *50*, 472–477. [[CrossRef](#)]
70. Roychoudhuri, R.; Hirahara, K.; Mousavi, K.; Clever, D.; Klebanoff, C.A.; Bonelli, M.; Sciume, G.; Zare, H.; Vahedi, G.; Dema, B.; et al. BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis. *Nature* **2013**, *498*, 506–510. [[CrossRef](#)]
71. Kim, E.H.; Gasper, D.J.; Lee, S.H.; Plisch, E.H.; Svaren, J.; Suresh, M. Bach2 regulates homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells and protects against fatal lung disease in mice. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 985–995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Sidwell, T.; Liao, Y.; Garnham, A.L.; Vasanthakumar, A.; Gloury, R.; Blume, J.; Teh, P.P.; Chisanga, D.; Thelemann, C.; de Labastida Rivera, F.; et al. Attenuation of TCR-induced transcription by Bach2 controls regulatory T cell differentiation and homeostasis. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 252. [[CrossRef](#)]
73. Yu, X.; Lao, Y.; Teng, X.L.; Li, S.; Zhou, Y.; Wang, F.; Guo, X.; Deng, S.; Chang, Y.; Wu, X.; et al. SENP3 maintains the stability and function of regulatory T cells via BACH2 deSUMOylation. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Roychoudhuri, R.; Eil, R.L.; Clever, D.; Klebanoff, C.A.; Sukumar, M.; Grant, F.M.; Yu, Z.; Mehta, G.; Liu, H.; Jin, P.; et al. The transcription factor BACH2 promotes tumor immunosuppression. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 599–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Grant, F.M.; Yang, J.; Nasrallah, R.; Clarke, J.; Sadiyah, F.; Whiteside, S.K.; Imianowski, C.J.; Kuo, P.; Vardaka, P.; Todorov, T.; et al. BACH2 drives quiescence and maintenance of resting Treg cells to promote homeostasis and cancer immunosuppression. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e20190711. [[CrossRef](#)]
76. Miyazaki, M.; Miyazaki, K.; Chen, S.; Itoi, M.; Miller, M.; Lu, L.F.; Varki, N.; Chang, A.N.; Broide, D.H.; Murre, C. Id2 and Id3 maintain the regulatory T cell pool to suppress inflammatory disease. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 767–776. [[CrossRef](#)]
77. Hwang, S.M.; Sharma, G.; Verma, R.; Byun, S.; Rudra, D.; Im, S.H. Inflammation-induced Id2 promotes plasticity in regulatory T cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4736. [[CrossRef](#)]
78. Zorn, E.; Nelson, E.A.; Mohseni, M.; Porcheray, F.; Kim, H.; Litsa, D.; Bellucci, R.; Raderschall, E.; Canning, C.; Soiffer, R.J.; et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* **2006**, *108*, 1571–1579. [[CrossRef](#)]
79. Kortylewski, M.; Xin, H.; Kujawski, M.; Lee, H.; Liu, Y.; Harris, T.; Drake, C.; Pardoll, D.; Yu, H. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 114–123. [[CrossRef](#)]
80. Chaudhry, A.; Rudra, D.; Treuting, P.; Samstein, R.M.; Liang, Y.; Kas, A.; Rudensky, A.Y. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* **2009**, *326*, 986–991. [[CrossRef](#)]
81. Oweida, A.J.; Darragh, L.; Phan, A.; Binder, D.; Bhatia, S.; Mueller, A.; Court, B.V.; Milner, D.; Raben, D.; Woessner, R.; et al. STAT3 Modulation of Regulatory T Cells in Response to Radiation Therapy in Head and Neck Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2019**, *111*, 1339–1349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. He, W.; Zhu, Y.; Mu, R.; Xu, J.; Zhang, X.; Wang, C.; Li, Q.; Huang, Z.; Zhang, J.; Pan, Y.; et al. A Jak2-selective inhibitor potently reverses the immune suppression by modulating the tumor microenvironment for cancer immunotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *145*, 132–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Rebe, C.; Ghiringhelli, F. STAT3, a Master Regulator of Anti-Tumor Immune Response. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 1280. [[CrossRef](#)]
84. Hayden, M.S.; Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **2008**, *132*, 344–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Grinberg-Bleyer, Y.; Caron, R.; Seeley, J.J.; De Silva, N.S.; Schindler, C.W.; Hayden, M.S.; Klein, U.; Ghosh, S. The Alternative NF-kappaB Pathway in Regulatory T Cell Homeostasis and Suppressive Function. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 2362–2371. [[CrossRef](#)]
86. Di Pilato, M.; Kim, E.Y.; Cadilha, B.L.; Prussmann, J.N.; Nasrallah, M.N.; Seruggia, D.; Usmani, S.M.; Misale, S.; Zappulli, V.; Carrizosa, E.; et al. Targeting the CBM complex causes Treg cells to prime tumours for immune checkpoint therapy. *Nature* **2019**, *570*, 112–116. [[CrossRef](#)]
87. Heuser, C.; Gotot, J.; Piotrowski, E.C.; Philipp, M.S.; Courreges, C.J.F.; Otte, M.S.; Guo, L.; Schmid-Burgk, J.L.; Hornung, V.; Heine, A.; et al. Prolonged IKKbeta Inhibition Improves Ongoing CTL Antitumor Responses by Incapacitating Regulatory T Cells. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 578–586. [[CrossRef](#)]
88. Cheng, L.; Deng, N.; Yang, N.; Zhao, X.; Lin, X. Malt1 Protease Is Critical in Maintaining Function of Regulatory T Cells and May Be a Therapeutic Target for Antitumor Immunity. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 3008–3019. [[CrossRef](#)]
89. Rosenbaum, M.; Gewies, A.; Pechloff, K.; Heuser, C.; Engleitner, T.; Gehring, T.; Hartjes, L.; Krebs, S.; Krappmann, D.; Kriegsmann, M.; et al. Bcl10-controlled Malt1 paracaspase activity is key for the immune suppressive function of regulatory T cells. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2352. [[CrossRef](#)]
90. Oh, H.; Grinberg-Bleyer, Y.; Liao, W.; Maloney, D.; Wang, P.; Wu, Z.; Wang, J.; Bhatt, D.M.; Heise, N.; Schmid, R.M.; et al. An NF-kappaB Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* **2017**, *47*, 450–465.e5. [[CrossRef](#)]
91. Konczalla, L.; Perez, D.R.; Wenzel, N.; Wolters-Eisfeld, G.; Klemp, C.; Luddeke, J.; Wolski, A.; Landschulze, D.; Meier, C.; Buchholz, A.; et al. Biperiden and mepazine effectively inhibit MALT1 activity and tumor growth in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 1618–1630. [[CrossRef](#)]
92. Wang, Y.; Lu, J.; Jiang, B.; Guo, J. The roles of curcumin in regulating the tumor immunosuppressive microenvironment. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 3059–3070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Xiao, Z.; Su, Z.; Han, S.; Huang, J.; Lin, L.; Shuai, X. Dual pH-sensitive nanodrug blocks PD-1 immune checkpoint and uses T cells to deliver NF-kappaB inhibitor for antitumor immunotherapy. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaay7785. [[CrossRef](#)]

94. Bhattacharyya, S.; Md Sakib Hossain, D.; Mohanty, S.; Sankar Sen, G.; Chattopadhyay, S.; Banerjee, S.; Chakraborty, J.; Das, K.; Sarkar, D.; Das, T.; et al. Curcumin reverses T cell-mediated adaptive immune dysfunctions in tumor-bearing hosts. *Cell. Mol. Immunol.* **2010**, *7*, 306–315. [[CrossRef](#)]
95. Zou, J.Y.; Su, C.H.; Luo, H.H.; Lei, Y.Y.; Zeng, B.; Zhu, H.S.; Chen, Z.G. Curcumin converts Foxp3+ regulatory T cells to T helper 1 cells in patients with lung cancer. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 1420–1428. [[CrossRef](#)]
96. Xu, B.; Yu, L.; Zhao, L.Z. Curcumin up regulates T helper 1 cells in patients with colon cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 1866–1875. [[PubMed](#)]
97. Li, T.; Li, X.; Zamani, A.; Wang, W.; Lee, C.N.; Li, M.; Jin, J.; Ramachandran, M.; Qingguo, R.; Weiyun, S.; et al. c-Rel is a myeloid checkpoint for cancer immunotherapy. *Nat. Cancer* **2020**, *1*, 507–517. [[CrossRef](#)]
98. Gao, F.; Cheng, Q.; Liu, M.D.; Rong, L.; Liu, C.J.; Zhang, X.Z. Local T regulatory cells depletion by an integrated nanodrug system for efficient chem-immunotherapy of tumor. *Sci. China Chem.* **2019**, *62*, 1230–1244. [[CrossRef](#)]
99. Shono, Y.; Tuckett, A.Z.; Liou, H.C.; Doubrovina, E.; Derenzini, E.; Ouk, S.; Tsai, J.J.; Smith, O.M.; Levy, E.R.; Kreines, F.M.; et al. Characterization of a c-Rel Inhibitor That Mediates Anticancer Properties in Hematologic Malignancies by Blocking NF-kappaB-Controlled Oxidative Stress Responses. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 377–389. [[CrossRef](#)]
100. Neo, W.H.; Lim, J.F.; Grumont, R.; Gerondakis, S.; Su, I.H. c-Rel regulates Ezh2 expression in activated lymphocytes and malignant lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 31693–31707. [[CrossRef](#)]
101. Hunter, J.E.; Butterworth, J.A.; Zhao, B.; Sellier, H.; Campbell, K.J.; Thomas, H.D.; Bacon, C.M.; Cockell, S.J.; Gewurz, B.E.; Perkins, N.D. The NF-kappaB subunit c-Rel regulates Bach2 tumour suppressor expression in B-cell lymphoma. *Oncogene* **2016**, *35*, 3476–3484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Grumont, R.J.; Gerondakis, S. Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4) expression in lymphocytes: Modulation of interferon-regulated gene expression by rel/nuclear factor kappaB. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 1281–1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Xia, Y.; Shen, S.; Verma, I.M. NF-kappaB, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 823–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Gilmore, T.D.; Herscovitch, M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* **2006**, *25*, 6887–6899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Baud, V.; Karin, M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 33–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Leporini, C.; Pisano, A.; Russo, E.; D'Arrigo, G.; de Sarro, G.; Coppolino, G.; Bolignano, D. Effect of pentoxifylline on renal outcomes in chronic kidney disease patients: A systematic review and meta-analysis. *Pharm. Res.* **2016**, *107*, 315–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Arvey, A.; van der Veecken, J.; Samstein, R.M.; Feng, Y.; Stamatoyannopoulos, J.A.; Rudensky, A.Y. Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 580–587. [[CrossRef](#)]
108. DuPage, M.; Chopra, G.; Quiros, J.; Rosenthal, W.L.; Morar, M.M.; Holohan, D.; Zhang, R.; Turka, L.; Marson, A.; Bluestone, J.A. The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. *Immunity* **2015**, *42*, 227–238. [[CrossRef](#)]
109. Yang, X.P.; Jiang, K.; Hirahara, K.; Vahedi, G.; Afzali, B.; Sciume, G.; Bonelli, M.; Sun, H.W.; Jankovic, D.; Kanno, Y.; et al. EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10643. [[CrossRef](#)]
110. Wang, D.; Quiros, J.; Mahuron, K.; Pai, C.C.; Ranzani, V.; Young, A.; Silveria, S.; Harwin, T.; Abnousian, A.; Pagani, M.; et al. Targeting EZH2 Reprograms Intratumoral Regulatory T Cells to Enhance Cancer Immunity. *Cell Rep.* **2018**, *23*, 3262–3274. [[CrossRef](#)]
111. Goswami, S.; Apostolou, I.; Zhang, J.; Skepner, J.; Anandhan, S.; Zhang, X.; Xiong, L.; Trojer, P.; Aparicio, A.; Subudhi, S.K.; et al. Modulation of EZH2 expression in T cells improves efficacy of anti-CTLA-4 therapy. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 3813–3818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Kim, K.H.; Roberts, C.W. Targeting EZH2 in cancer. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 128–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Zingg, D.; Arenas-Ramirez, N.; Sahin, D.; Rosalia, R.A.; Antunes, A.T.; Haeusel, J.; Sommer, L.; Boyman, O. The Histone Methyltransferase Ezh2 Controls Mechanisms of Adaptive Resistance to Tumor Immunotherapy. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 854–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

114. Wang, L.; Beier, U.H.; Akimova, T.; Dahiya, S.; Han, R.; Samanta, A.; Levine, M.H.; Hancock, W.W. Histone/protein deacetylase inhibitor therapy for enhancement of Foxp3+ T-regulatory cell function posttransplantation. *Am. J. Transpl.* **2018**, *18*, 1596–1603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Shen, L.; Ciesielski, M.; Ramakrishnan, S.; Miles, K.M.; Ellis, L.; Sotomayor, P.; Shrikant, P.; Fenstermaker, R.; Pili, R. Class I histone deacetylase inhibitor entinostat suppresses regulatory T cells and enhances immunotherapies in renal and prostate cancer models. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30815. [[CrossRef](#)]
116. Xiong, Y.; Wang, L.; Di Giorgio, E.; Akimova, T.; Beier, U.H.; Han, R.; Trevisanut, M.; Kalin, J.H.; Cole, P.A.; Hancock, W.W. Inhibiting the coregulator CoREST impairs Foxp3+ Treg function and promotes antitumor immunity. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 1830–1842. [[CrossRef](#)]
117. Liu, Y.; Wang, L.; Predina, J.; Han, R.; Beier, U.H.; Wang, L.C.; Kapoor, V.; Bhatti, T.R.; Akimova, T.; Singhal, S.; et al. Inhibition of p300 impairs Foxp3(+) T regulatory cell function and promotes antitumor immunity. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1173–1177. [[CrossRef](#)]
118. Bates, S.E. Epigenetic Therapies for Cancer. *New Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 650–663. [[CrossRef](#)]
119. Moreno Ayala, M.A.; Li, Z.; DuPage, M. Treg programming and therapeutic reprogramming in cancer. *Immunology* **2019**, *157*, 198–209. [[CrossRef](#)]
120. Lio, C.W.; Hsieh, C.S. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* **2008**, *28*, 100–111. [[CrossRef](#)]
121. Chinen, T.; Kannan, A.K.; Levine, A.G.; Fan, X.; Klein, U.; Zheng, Y.; Gasteiger, G.; Feng, Y.; Fontenot, J.D.; Rudensky, A.Y. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 1322–1333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Wu, Y.; Borde, M.; Heissmeyer, V.; Feuerer, M.; Lapan, A.D.; Stroud, J.C.; Bates, D.L.; Guo, L.; Han, A.; Ziegler, S.F.; et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **2006**, *126*, 375–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Garg, G.; Muschawekch, A.; Moreno, H.; Vasanthakumar, A.; Floess, S.; Lepennetier, G.; Oellinger, R.; Zhan, Y.; Regen, T.; Hiltensperger, M.; et al. Blimp1 Prevents Methylation of Foxp3 and Loss of Regulatory T Cell Identity at Sites of Inflammation. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 1854–1868.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Franckaert, D.; Dooley, J.; Roos, E.; Floess, S.; Huehn, J.; Luche, H.; Fehling, H.J.; Liston, A.; Linterman, M.A.; Schlenner, S.M. Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3(+) and Foxp3(-) T cells. *Immunol. Cell Biol.* **2015**, *93*, 417–423. [[CrossRef](#)]
125. Bittner-Eddy, P.D.; Fischer, L.A.; Costalonga, M. Cre-loxP Reporter Mouse Reveals Stochastic Activity of the Foxp3 Promoter. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2228. [[CrossRef](#)]
126. Wu, D.; Huang, Q.; Orban, P.C.; Levings, M.K. Ectopic germline recombination activity of the widely used Foxp3-YFP-Cre mouse: A case report. *Immunology* **2020**, *159*, 231–241. [[CrossRef](#)]
127. Rubtsov, Y.P.; Niec, R.E.; Josefowicz, S.; Li, L.; Darce, J.; Mathis, D.; Benoist, C.; Rudensky, A.Y. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* **2010**, *329*, 1667–1671. [[CrossRef](#)]
128. Cortez, J.T.; Montauti, E.; Shifrut, E.; Gatchalian, J.; Zhang, Y.; Shaked, O.; Xu, Y.; Roth, T.L.; Simeonov, D.R.; Zhang, Y.; et al. CRISPR screen in regulatory T cells reveals modulators of Foxp3. *Nature* **2020**, *582*, 416–420. [[CrossRef](#)]
129. Loo, C.S.; Gatchalian, J.; Liang, Y.; Leblanc, M.; Xie, M.; Ho, J.; Venkatraghavan, B.; Hargreaves, D.C.; Zheng, Y. A Genome-wide CRISPR Screen Reveals a Role for the Non-canonical Nucleosome-Remodeling BAF Complex in Foxp3 Expression and Regulatory T Cell Function. *Immunity* **2020**, *53*, 143–157.e8. [[CrossRef](#)]
130. Schumann, K.; Raju, S.S.; Lauber, M.; Kolb, S.; Shifrut, E.; Cortez, J.T.; Skartsis, N.; Nguyen, V.Q.; Woo, J.M.; Roth, T.L.; et al. Functional CRISPR dissection of gene networks controlling human regulatory T cell identity. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 1456–1466. [[CrossRef](#)]
131. Postow, M.A.; Sidlow, R.; Hellmann, M.D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *New Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 158–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Fraser, J.H.; Rincon, M.; McCoy, K.D.; Le Gros, G. CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells. *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 838–844. [[CrossRef](#)]
133. Walker, L.S.K. PD-1 and CTLA4: Two checkpoints, one pathway? *Sci. Immunol.* **2017**, *2*, eaan3864. [[CrossRef](#)]
134. Fenwick, C.; Loredó-Varela, J.L.; Joo, V.; Pellaton, C.; Farina, A.; Rajah, N.; Esteves-Leuenberger, L.; Decaillon, T.; Suffiotti, M.; Noto, A.; et al. Tumor suppression of novel anti-PD-1 antibodies mediated through CD28 costimulatory pathway. *J. Exp. Med.* **2019**, *216*, 1525–1541. [[CrossRef](#)]

135. Jutz, S.; Hennig, A.; Paster, W.; Asrak, O.; Dijanovic, D.; Kellner, F.; Pickl, W.F.; Huppa, J.B.; Leitner, J.; Steinberger, P. A cellular platform for the evaluation of immune checkpoint molecules. *Oncotarget* **2017**, *8*, 64892–64906. [[CrossRef](#)]
136. Huynh, A.; DuPage, M.; Priyadharshini, B.; Sage, P.T.; Quiros, J.; Borges, C.M.; Townamchai, N.; Gerriets, V.A.; Rathmell, J.C.; Sharpe, A.H.; et al. Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 188–196. [[CrossRef](#)]
137. Wang, Y.; Zhang, G.; Jin, J.; Degan, S.; Tameze, Y.; Zhang, J.Y. MALT1 promotes melanoma progression through JNK/c-Jun signaling. *Oncogenesis* **2017**, *6*, e365. [[CrossRef](#)]
138. Nagel, D.; Spranger, S.; Vincendeau, M.; Grau, M.; Raffegerst, S.; Kloo, B.; Hlahla, D.; Neuenschwander, M.; Peter von Kries, J.; Hadian, K.; et al. Pharmacologic inhibition of MALT1 protease by phenothiazines as a therapeutic approach for the treatment of aggressive ABC-DLBCL. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 825–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Schon, M.; Wienrich, B.G.; Kneitz, S.; Sennefelder, H.; Amschler, K.; Vohringer, V.; Weber, O.; Stiewe, T.; Ziegelbauer, K.; Schon, M.P. KINK-1, a novel small-molecule inhibitor of IKKbeta, and the susceptibility of melanoma cells to antitumoral treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* **2008**, *100*, 862–875. [[CrossRef](#)]
140. Edward, M.; MacKie, R.M. Pentoxifylline enhances lung colonization and alters cell adhesion and glycosaminoglycan synthesis by metastatic B16 melanoma cells. *Int. J. Cancer* **1991**, *49*, 711–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Ratheesh, A.; Ingle, A.; Gude, R.P. Pentoxifylline modulates cell surface integrin expression and integrin mediated adhesion of B16F10 cells to extracellular matrix components. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1743–1752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Oh, H.; Ghosh, S. NF-kappaB: Roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol. Rev.* **2013**, *252*, 41–51. [[CrossRef](#)]
143. Barnes, S.E.; Wang, Y.; Chen, L.; Molinero, L.L.; Gajewski, T.F.; Evaristo, C.; Alegre, M.L. T cell-NF-kappaB activation is required for tumor control in vivo. *J. Immunother. Cancer* **2015**, *3*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Evaristo, C.; Spranger, S.; Barnes, S.E.; Miller, M.L.; Molinero, L.L.; Locke, F.L.; Gajewski, T.F.; Alegre, M.L. Cutting Edge: Engineering Active IKKbeta in T Cells Drives Tumor Rejection. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 2933–2938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Sievers, E.L.; Senter, P.D. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annu. Rev. Med.* **2013**, *64*, 15–29. [[CrossRef](#)]
146. Knochelmann, H.M.; Dwyer, C.J.; Bailey, S.R.; Amaya, S.M.; Elston, D.M.; Mazza-McCrann, J.M.; Paulos, C.M. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* **2018**, *15*, 458–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).