

Université catholique de Louvain
Faculté de Médecine
Institut de Duve
Institut Ludwig de Recherche sur le Cancer SA

**Résistance tumorale au rejet immunitaire par induction
d'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques anti-
tumoraux**

Céline Powis de Tenbossche

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et
Pharmaceutiques
Orientation : Immunologie des Tumeurs

Promoteur : Pr Benoît Van Den Eynde
Co-Promoteur : Dr Catherine Uyttenhove
Année Académique : 2014-2015

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du Jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Professeur Benoît Van den Eynde, de m'avoir acceptée dans son laboratoire et d'avoir pris du temps pour me faire découvrir le vaste domaine de l'immunologie tumorale. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée en me confiant le projet de mélanome induit.

Je remercie également le Docteur Catherine Uyttenhove pour m'avoir accueillie au sein de son unité, de m'avoir transmis les bases de la rigueur scientifique et d'avoir passé tant d'heures à corriger mes écrits.

This acknowledgment wouldn't be complete if I didn't address a particular thanks to Stefania Cane. Thanks for your help, your disponibility, your smile, your friendship and all your personality. This thesis is much more funny since you integrated the TiRP-10B project. Grazie di tutto !

Je remercie Dominique Donckers pour sa présence, sa disponibilité, sa gentillesse et ses anecdotes sur les membres du laboratoire qui ont rendu les journées moins longues et moins monotones.

Ces remerciements sont aussi dirigés à tous les membres, anciens et actuels de l'unité du Professeur Benoît Van den Eynde, Caroline Hervé, Florence Depontieu, Benoît Guillaume, Nicolas Parmentier, Alexandre Dalet, Luc Pilotte, Aline Depasse, Nathalie Vigneron, Wenbin Ma, Jing-Jing Zhu, Florence Schramme, Alexandre Michaux, Violette François, Delia Hoffmann, Rui Cheng, Simon Klaessens, Marine Blackman, Marie Solvay, etc. Merci également à Julie Lesenfants pour ses corrections et ses discussions diverses et variées dans le bureau.

Mes remerciements vont également envers l'équipe du Docteur Nicolas van Baren. Merci Marjorie de m'avoir aidée dans de nombreuses expériences non seulement en m'aidant à mettre les protocoles au point mais également d'avoir discuté sur de nombreuses idées d'expériences. Il y avait de très bonnes choses, car même si je n'ai pu les réaliser moi-même, différentes personnes les utilisent à l'heure actuelle. Merci pour ton amitié qui date depuis mes premiers jours dans le laboratoire. Merci également à toi et à Aurélie Daumérie d'avoir faim à la même heure que moi...

Je ne pourrai pas passer à coté de l'équipe souris, sans votre travail, je ne serai jamais arrivée au bout de cette thèse. Merci au Docteur Guy Warnier avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau durant quelques années. Merci pour ta disponibilité, tes conseils lors de mes différentes réunions et particulièrement avec le Professeur Thierry Boon, tes blagues et

anecdotes diverses. Merci. Je remercie également le Docteur Gilles Gaudray pour ces longues discussions et ces déjeuners que je ne décrirai pas. Merci à « ta » Florence qui m'a montré que je pouvais te charrier à outrance. Mais bon, tu me le rendais bien. Merci à Laurent et Julien d'avoir inlassablement coupé des queues de souris, sevré des milliers de souriceaux, et m'avoir préparé des centaines de boîtes contenant chacune des dizaines de souris.

J'aimerais également remercier toute l'équipe de Manu pour le temps qu'ils passent à nous faciliter la vie. Merci à Pascale pour les nombreux fous rires et les discussions qui m'ont souvent changé les idées. Merci pour ta disponibilité. Bien sûr, je remercie particulièrement Jean pour son sourire, sa bonne humeur, le bonjour de tous les jours, son efficacité et sa disponibilité, sa gentillesse et ses croche-pieds « involontaires ».

Je remercie Julie et Suzanne pour leur aide précieuse, leurs compétences et leur disponibilité.

Je voudrais particulièrement remercier Isabelle Jacquemart qui a été une collègue durant de nombreuses années et qui est restée une amie précieuse. Merci de m'avoir encouragée, de m'avoir soutenue et merci pour ces longues discussions à propos de sciences ou non.

Merci également à Stéphanie d'Hondt pour notre amitié de tous les jours et nos discussions diverses, mais jamais monotones sur le balcon. Merci pour tes encouragements et tes conseils.

Je n'oublie pas mes amis qui m'ont soutenue et qui sont toujours présents au cours de cette éprouvante thèse. Merci à Didier, Alex, Emerick, Marie-Pierre, Astrid, etc.

Je remercie également Julien pour son soutien et son aide. Merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien.

Mes remerciements ne seraient pas complets si j'oubliais mes parents qui m'ont donné non seulement le goût de la biologie mais qui m'ont permis de réaliser mes projets. Je remercie Virginie et Michaël, mon frère, mes grands-parents, et autres membres de ma famille, leur amitié, leur disponibilité, leurs discussions et leur aide dans tout les domaines et de tous les instants.

Enfin, après 7 ans, je pourrai répondre, « Cette année c'était la bonne, j'ai terminé ma thèse ».

Résumé

L'étude des interactions entre le système immunitaire et le développement tumoral est difficile à réaliser chez l'homme. Pourtant la compréhension de ces interactions permettrait d'améliorer les protocoles de vaccination humaine. Au sein du laboratoire, un modèle transgénique de mélanome inductible murin a été développé. Par rapport aux modèles de mélanomes transplantables, ce modèle reproduit plus fidèlement l'ensemble des interactions entre le système immunitaire et les tumeurs en développement. Chez ces souris, nommées TiRP-10B, l'administration de 4-OH Tamoxifen induit le développement de tumeurs pigmentées à croissance lente et de tumeurs non-pigmentées à croissance rapide. Ces deux types de tumeurs expriment l'antigène tumoral P1A.

Dans un premier temps, nous avons immunisé nos souris contre l'antigène tumoral P1A et nous les avons traitées avec du 4-OH Tamoxifen. Malgré l'induction d'une bonne réponse lymphocytaire T CD8 anti-P1A, nous n'avons pas observé d'effet sur l'incidence des tumeurs. Ces résultats indiquent l'existence d'un mécanisme de résistance immunitaire. Nous n'avons pas observé de perte d'expression de l'antigène P1A. Par contre, la réponse CD8 anti-P1A disparaissait dès lors que la souris portait une tumeur non-pigmentée. Cette disparition était spécifique de l'antigène tumoral P1A et les souris porteuses de tumeurs restaient capables de répondre contre d'autres antigènes. Dans un deuxième temps, nous avons montré que le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 activés anti-P1A ne permettait pas le rejet des tumeurs induites, alors que ce transfert permettait le rejet des tumeurs transplantables de mêmes caractéristiques génétiques. Nous avons montré que les lymphocytes anti-P1A transférés étaient capables d'infiltrer les tumeurs, de s'activer et de produire de l'interféron- γ . Cependant, ils disparaissaient très rapidement par apoptose. Cette apoptose dépend de l'interféron- γ et de la voie Fas/FasL. Elle ne se produit pas dans les tumeurs transplantées. L'apoptose est donc déclenchée par FasL, dont l'expression est induite par l'interféron- γ produit par les lymphocytes T eux-mêmes. Il reste à déterminer quelles cellules expriment FasL dans le microenvironnement tumoral, et à comprendre pourquoi l'apoptose des lymphocytes T se produit dans les tumeurs induites et pas dans les tumeurs transplantées.

L'ensemble des travaux réalisés contribue à la description d'un mécanisme tumoral de résistance immunitaire qui induit la disparition des lymphocytes T CD8 spécifique des antigènes tumoraux.

Sommaire

Remerciements	3
Résumé.....	5
Sommaire	7
Abréviations.....	9
Liste des tableaux et des figures	11
Introduction	13
Mélanomes humains	13
Chimiothérapie	13
Immunothérapie.....	14
Mécanismes de régulation immunitaire impliqués dans la résistance tumorale au rejet ...	19
Paralysie des lymphocytes T.....	19
T régulateurs	23
T régulateurs dérivant du thymus (nTreg ou tTreg).....	23
T régulateurs périphériques.....	24
T régulateurs ICOS ⁺ (ICOS ⁺ Treg).....	25
T régulateurs CD8 ⁺	26
Tregs et tumeurs.....	26
Cytokines immunosuppressives	27
IL-10	28
TGFβ	28
MDSC.....	30
Privation en acides aminés.....	32
L-Arginine	32
L-Tryptophane.....	34
Indolémine 2,3-dioxygénase.....	34
Tryptophane 2,3-dioxygénase	35
Cystéine.....	36
Molécules de co-stimulation négative	36
CTLA-4.....	38
PD-1 / PD-L1.....	38
Les galectines	40
Galectine – 1	41
Galectine-3.....	43
Galectine-9.....	45
Apoptose des lymphocytes T	48
Voies de signalisation dépendantes des caspases.....	49
Les caspases	49
Voie de signalisation extrinsèque.....	51
Voie de signalisation intrinsèque	56
Collaboration entre la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.....	61
Autre voies d'Apoptose	62
Mécanismes d'induction d'apoptose des lymphocytes	63
Les récepteurs de mort cellulaire	63
Fas et FasL.....	63
TNFR1 et 2 /TNFα.....	68

TRAIL-R / TRAIL (TNF-related Apoptosis Inducing Ligand-Receptor).....	72
DR3/TWEAK.....	75
DR6.....	76
Modèle murin de mélanome inducible TiRP-10B	77
Réponse immunitaire	81
Signature inflammatoire.....	81
Réponse lymphocytaire CD8	82
Objectifs.....	85
Résultats.....	87
Discussion.....	115
Différences entre tumeurs transplantées et tumeurs induites.....	115
Ignorance immunitaire.....	117
Perte de la reconnaissance antigénique.....	118
Paralysie des lymphocytes T.....	119
Délétion des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux.....	120
Les MDSCs.....	122
Les cellules tumorales.....	125
Les cellules endothéliales	126
Les lymphocytes T régulateurs	127
Les lymphocytes T CD8.....	127
Sensibilisation des lymphocytes T à l'apoptose	129
Les Galectines	131
Conclusions générale de l'étude	132
Conclusions.....	134
Matériels et Méthodes	137
Bibliographie	145

Abréviations

AICD	Activation Induced Cell Death
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotic Protease Activatin Factor-1
APC	Antigen Presenting Cell
ApoL	Apoptosis Inducing Ligand
ASC	Alanine-Serine-Cystein transporter
Asp	Aspartique
Bad	Bcl-2 Associated Death promoter
Bak	Bcl-2 Antagonist / Killer
Bax	Bcl-2 Associated X protein
Bcl-2	B cell lymphomas 2
Bcl-X _L	Bcl-2 Like 1 isoform 1
BH	Binding Homology
Bid	BH3 Interacting Domain
BIM	Bcl-2 interactin Mediator
CAD	Caspase-Activated DNase
CARD	Caspase Recruitment Domain
CASPASE	CysteinyI Aspartate Cleaving ProteASE
cFLIP	cellular FLICe/Caspase-8 like Inhibitor Protein
CIA	Collagen Induced Arthtitis
CRD	Cystein Rich Domain
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocytes Associated protein 4
Cys	Cysteine
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DIABLO	Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with Low pH
DISC	Death Inducing signaling Complexe
DR	Death Receptor
EBV	Epstein Bar Virus
EMT	Epithelium Mesenchymal Transition
FADD	Fas Associated Death Domain
FAP	Fibroblast Activation Protein
FasL	Fas Ligand
FDA	Food and Drug Administration
GITR	Glucocorticoid-Induced TNFR
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-Colony-Stimulating Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTRA2	High-Temperature Requirement protein A2
IAP	Inhibitor of APoptosis
ICAD	Inhibitor Caspase Activated DNase
ICAD	Inhibitor Caspase-Activated DNase
IFA	Adjuvant Incomplet de Freund
IFN γ	InterFeroN gamma
IMC	Immature Myeloid Cell
iTreg	Induce Treg
Lag-3	Lymphocyte-Activation Gene-3
LCMV	Lymphocytic ChoriMeningitis Virus
LT α	Lymphotoxine α
MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cell
mFasL	Membran FasL

MMP	Metalloprotease
Mo-MDSC	Monocytic-MDSC
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MP-s	Metalloprotease Substrate Sites
NK	Natural Killer
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
Noxa	<i>Latin origin: damage</i>
nTreg	Treg naturel
PARP	Poly ADP-ribose Polymerase
PD-1	Programmed cell Death 1
PD-L1	Programmed cell Death Ligand 1
PGE-2	Prostaglandine-2
PHA	PhytoHemAgglutinine
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PMN-MDSC	Polymorphonuclear-MDSC
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRD	Proline Rich Domain
PS	Phosphatidyl Serine
pTreg	T régulateur périphérique
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
ROS	Reactive oxygen Species
sFasL	Soluble FasL
SMAC	Second Mitochondria derived Activator of Caspase
SODD	Silencer Of Death Domain
TCR	T Cell Receptor
Th1	T helper 1
Th17	T helper 17
Th2	T helper 2
Th3	T helper 3
THD	TNF Homolog Domain
TNFR	Tumor Necrosis Factor α Receptor
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
Tr1	T régulateur 1
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg	Lymphocyte T Regulator
TRID	TNF Receptor Internalization Domain
tTreg	Thymic Treg
TWEAK	TNF-like Weak Inducer of Apoptosis
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor
XIAP	X chromosome Linked IAP

Liste des tableaux et des figures

Tableau 1 : Liste non exhaustive de quelques antigènes tumoraux.	15
Tableau 2 : Nomenclature et caractéristiques des différentes populations de Treg.	26
Tableau 3 : Les différentes caspases des mammifères, leur fonction et leur structure.	50
Tableau 4 : Les récepteurs de mort cellulaire et leurs ligands.	51
Figure 1 : Stratégie d'immunosuppression utilisée par les cellules tumorales pour échapper qu système immunitaire.....	22
Figure 2 : Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs.....	24
Figure 3 : Mécanisme de recrutement, d'activation et de suppression des différentes populations de cellules myéloïdes.	31
Figure 4 : Représentation des différents points de contrôle de l'activation des lymphocytes T.....	37
Figure 5 : Classification des galectines selon le nombre de domaine de reconnaissance et leur oligomérisation.....	41
Figure 6 : Représentation schématique de la structure des différents récepteurs DR.....	52
Figure 7 : Représentation schématique du changement de conformation du récepteur Fas suite à la fixation de son ligand, FasL.	53
Figure 8 : Représentation schématique de la voie de signalisation extrinsèque.....	54
Figure 9 : Représentation schématique des interactions entre la pro-caspase 8 et la protéine inhibitrice cFLIP.....	55
Figure 10 : Structure et classification des membres de la famille Bcl-2.....	56
Figure 11 : Représentation schématique de la voie d'apoptose intrinsèque.	58
Figure 12 : Représentation des différentes interactions des protéines de la famille Bcl-2.....	60
Figure 13 : Représentation schématique de la structure de FasL.....	64
Figure 14 : Représentation schématique des voies de signalisation du récepteur TNFR1 suite à la fixation du TNF α	70
Figure 15 : Représentation schématique du modèle de mélanome induit.....	78
Figure 17 : P1A gene expression.....	88
Figure 18 : Tumors induce antigen-specific CD8 ⁺ T cells deletion.....	90
Figure 19 : Ability of tumor-bearing mice to mount a CTL immune response.....	92
Figure 20 : Transferred P1ATCR CD8 ⁺ T cells are inefficient against inducible tumors but reject transplantable tumors	94
Figure 21 : Transferred P1ATCR CD8 ⁺ T cells reject transplantable tumors.....	96
Figure 22 : P1A Tg TCR clonotypic PCR.....	96
Figure 23 : Numbers and phenotype of P1ATCR CD8 ⁺ T cells 4 days after transfer	98
Figure 24 : Activity of P1ATCR CD8 ⁺ T cells in tumor-bearing mice	100
Figure 25 : Apoptosis of P1ATCR CD8 ⁺ T cells 4 days after transfer.....	102
Figure 26 : Role of IFN γ in P1ATCR CD8 ⁺ T cells apoptosis	104
Figure 27 : Role of PD-1 in P1ATCR CD8 ⁺ T cells apoptosis	106
Figure 28 : Expression of IDO	108
Figure 29 : Role of MO-MDSC in P1ATCR CD8 ⁺ T cells apoptosis	110

Figure 30 : Role of Fas and FasL in P1ATCR CD8+ T cells apoptosis	112
Figure 31 : Représentation schématique des voies de signalisation qui contrôlent l'expression de FasL et de Bcl-2	130
Figure 32 : Représentation schématique des voies de signalisation qui contrôlent la sensibilité à l'apoptose des lymphocytes T	131
Figure 33 : Représentation schématique des mécanismes induisant l'apoptose des lymphocytes T ainsi que les différentes cibles pour les inhiber dans le modèle de mélanome inducible TiRP-10B	133

Introduction

Mélanomes humains

Le mélanome est la forme de cancer de la peau la plus grave chez l'homme. En Europe, il représente le neuvième cancer le plus fréquent et connaît une évolution croissante (European skin cancer). En effet, la fréquence du mélanome augmente de 3 à 7% chaque année dans le monde [1]. Le meilleur moyen de diminuer la mortalité due au mélanome est de réaliser une ablation chirurgicale dès les premiers signes de la maladie. Si le mélanome est local et confiné à l'épiderme, la survie à 5 ans atteint plus de 98%. Par contre, si le mélanome est diagnostiqué à un stade plus avancé, la survie est seulement de 6 à 9 mois [2]. Cette forte mortalité est due à un développement rapide de métastases au niveau du poumon, du cerveau, du foie et des os chez un patient sur trois [3, 4]. Pour lutter contre les mélanomes de stade avancé, deux axes de traitement sont étudiés : la chimiothérapie et l'immunothérapie.

Chimiothérapie

Jusqu'en 2011, la Dacarbazine était un des seuls traitements chimiothérapeutiques autorisé par la « Food and Drug Administration » (FDA) dans les formes avancées du cancer de la peau. Mais l'efficacité de ce traitement était limitée car seuls 10 à 25% des patients traités montraient des signes d'amélioration et ceux-ci étaient souvent de courte durée [5,

6]. La caractérisation en 2002 des mutations les plus courantes dans le mélanome humain [7] a permis le développement d'inhibiteurs spécifiques contre ces protéines mutées. La découverte de la mutation V600E dans l'oncogène BRAF dans 60% des cas de mélanomes humains a mené au développement d'un inhibiteur compétitif du site catalytique muté de la protéine [8] entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules [9]. Cet inhibiteur, commercialisé sous le nom de Vemurafenib, a un effet positif chez 48% des patients traités [10]. Depuis, des inhibiteurs spécifiques d'autres protéines mutées ont été développés. L'Imatinib, par exemple, cible le gène c-KIT qui est muté dans 30% des mélanomes [11]. Son administration a un effet positif chez 23,3% des patients [12]. Malheureusement l'effet de ces inhibiteurs est de courte durée et les patients rechutent habituellement après 6 à 12 mois.

Immunothérapie

L'immunothérapie, qui inclut la vaccination anti-tumorale, est une autre stratégie pour induire le rejet des tumeurs ou ralentir la progression tumorale. La description par l'équipe du professeur Thierry Boon du premier antigène spécifique des mélanomes humains est considérée comme une percée dans ce domaine [13]. De nos jours, un grand nombre d'antigènes tumoraux ont été décrits pour différents types de cancers dont le mélanome. Ces antigènes sont classifiés en quatre groupes [14] :

- les antigènes de type MAGE, codés par les gènes « cancer-germline » qui ne sont exprimés que dans les cellules de la lignée germinale et dans de nombreuses tumeurs d'origine différentes, tels que MAGE ou NY-ESO-1
- les antigènes résultant de mutations ponctuelles affectant par exemple la protéine CLPP [15]
- les antigènes qui dérivent de protéines surexprimées dans les mélanomes tels que PRAME
- les antigènes codés par des gènes de différenciation mélanocytaire tels que Melan-A, ou gp100.

Les antigènes qui dérivent des « cancer germline genes » sont des cibles privilégiées pour les protocoles d'immunothérapie en raison de la spécificité de leur expression et du nombre important de tumeurs concernées. Une liste non exhaustive de différents antigènes est reprise dans le Tableau 1 : [16].

Tableau 1 : Liste non exhaustive de quelques antigènes tumoraux.

D'après Vigneron et al [16].

<i>Types d'antigènes</i>	<i>Gène</i>	<i>Position peptide</i>	<i>Référence</i>
Antigènes de type MAGE	MAGE-A1	160-169	[17]
		289-298	[18]
	MAGE-C1	959-968	[19]
		1083-1091	[19]
	MAGE-C2	42-50	[20]
		43-57	[21]
	Cyclin-A1	227-235	[22]
		341-351	[22]
Antigènes mutés	CLPP	240-248	[15]
Antigènes surexprimés	CD45	556-564	[23]
	Lengsin	270-279	[24]
	Survivin	97-111	[25]
	MUC5AC	716-724	[26]
Antigènes de différenciation	Melan-A/MART-1	21-50	[27]
	TRP-1	284-298	[28]
	Tyrosinase	368-373;336-340	[29]

Le choix du peptide antigénique utilisé ainsi que le mode de vaccination sont importants pour assurer une activation fonctionnelle aussi bien du système immunitaire adaptatif qu'inné. Différents protocoles de vaccination ont été mis au point à l'heure actuelle et ils peuvent être composés d'un peptide antigénique associé ou non à un « carrier » qui peut être soit un adjuvant [30], soit des cellules dendritiques [31] ou encore

un virus recombinant [32]. Ces protocoles de vaccination ont, dans un premier temps, été testés dans des modèles murins où ils montraient une grande efficacité [33-37].

Chez l'homme, malgré la présence de lymphocytes T spécifiques de l'antigène vaccinal dans le sang des patients immunisés, seuls 5 à 22% d'entre eux montrent des signes de régression ou de stabilisation [14, 38]. Sur 440 patients dont 422 porteurs d'un mélanome, vaccinés avec un peptide, 9 patients ont montré une réponse partielle et seulement 4 une réponse complète [39]. Le faible taux de réussite des protocoles d'immunothérapie n'est pas dû au faible nombre de T anti-tumoraux générés [40]. En effet une régression tumorale pouvait être observée même si le nombre de lymphocytes T anti-tumoraux circulants était très faible [41]; au contraire, une fréquence élevée de lymphocytes T anti-tumoraux pouvait aussi s'accompagner d'une croissance de la tumeur [38, 42]. Différentes études ont montré que les T infiltrant les mélanomes étaient inactifs [14, 43].

Une autre technique d'immunothérapie testée à l'heure actuelle est le transfert de lymphocytes T. Elle consiste à isoler les lymphocytes T infiltrant une tumeur, les stimuler *ex vivo* afin de les amplifier et les réinjecter chez les mêmes patients [44]. Dans le cas du transfert adoptif on observe un rejet complet des mélanomes dans 22 % des cas [37]. Le transfert adoptif peut également se faire avec des lymphocytes T autologues transduits avec les gènes codant un récepteur T (TCR) de spécificité connue ou des lymphocytes qui possèdent un récepteur antigénique chimérique (CAR T cell) [45]. Les lymphocytes T transduits sont amplifiés *in vitro* à partir de lymphocytes T autologues purifiés à partir du sang du patient et sont transduits avec un lentivirus ou un rétrovirus qui contient une séquence codante pour un TCR. Ce TCR possède une forte affinité pour un antigène exprimé par la tumeur du patient. La séquence codante de TCR provient d'un autre patient qui a répondu auparavant à l'antigène et qui possède des HLA compatibles [46]. Enfin, les CAR T cells sont des lymphocytes T transduits avec un rétrovirus qui possède la séquence codante pour la région variable d'un anticorps fusionné avec le domaine intra-cellulaire d'un TCR. Cette construction permet l'activation d'un lymphocyte T sans que la protéine cible ne soit présentée par une molécule HLA [47]. Son usage est cependant limité par le fait qu'il

n'existe pratiquement pas d'anticorps de surface reconnaissable par des anticorps et dont l'expression soit spécifique aux cellules tumorales. Comme pour les protocoles de vaccination avec des peptides, de très bons résultats sont observés dans les modèles murins [48, 49]. Différents protocoles de transfert adoptif ont été testés à l'heure actuelle chez l'homme et des résultats prometteurs ont été obtenus [47]. Par exemple, chez des patients atteints de mélanome on détecte une régression des métastases chez 30 % des patients ayant reçu des lymphocytes T transduits avec un TCR codant pour MART-1 ou gp100 [46].

Enfin une troisième approche d'immunothérapie est utilisée à l'heure actuelle. Il a été démontré que la qualité et l'amplitude d'une réponse lymphocytaire dépend de la balance entre les molécules de co-stimulation et les signaux inhibiteurs [50]. Bloquer les signaux inhibiteurs favoriserait le développement d'une réponse immunitaire efficace capable d'éliminer ou de contrôler la croissance tumorale [51]. Deux voies inhibitrices sont principalement étudiées à l'heure actuelle, la voie PD-1(Programmed cell Death 1)/PD-L1 (Programmed cell Death Ligand 1) et la voie CD28/CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocytes Associated protein 4). Nous détaillerons plus précisément les mécanismes d'inhibitions dans la suite de ce travail. Il a été montré chez des souris porteuses d'un mélanome que la combinaison d'un protocole de vaccination et d'un anticorps anti-CTLA-4 permettait d'augmenter la survie de ces souris de 50% [52]. Plusieurs anticorps dirigés contre PD-1, PD-L1 et CTLA-4 ont été testés chez l'homme. Ces anticorps favorisent une réponse immunitaire durable chez 30-35% [53] et 28% [54] des patients traités respectivement avec un anticorps anti-PD-1 ou un anti-CTLA-4. L'anti-CTLA-4 appelé ipilimumab a été approuvé par la FDA en 2011 et est actuellement utilisé dans le mélanome métastatique. En 2014, deux autres anti-PD1 ont également été approuvés dans le mélanome métastatique résistant à l'ipilimumab.

Ces traitements permettent des rémissions tumorales complètes et durables dans 25 à 50% des patients. Les recherches aujourd'hui tentent de comprendre pourquoi une proportion importante de patients ne répondent pas ou pas bien. Comme dans le cas des vaccinations, il apparaît de plus en plus clairement qu'un important facteur limitant l'efficacité de l'immunothérapie est le développement de mécanismes

d'immunosuppression locale qui se mettent en place au niveau de la tumeur. L'objectif est de comprendre ces mécanismes afin de développer des stratégies thérapeutiques permettant de les contourner. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail. Nous commencerons par décrire les mécanismes connus de résistance tumorale au rejet immunitaire, avant de décrire le modèle de mélanome inductible qui fera l'objet de nos travaux.

Mécanismes de régulation immunitaire impliqués dans la résistance tumorale au rejet

Paralysie des lymphocytes T

Sous le terme de paralysie des lymphocytes T, nous avons regroupé trois mécanismes physiologiques qui inhibent les réponses immunitaires dirigées contre des antigènes du soi ou limitent l'ampleur et la durée de réponses induites par des infections virales, bactériennes ou parasitaires. Ils mènent également au dysfonctionnement des lymphocytes T en présence de tumeurs. Cette paralysie est finement contrôlée, varie selon la nature de l'antigène et de sa persistance, ainsi que du contexte dans lequel le T naïf le reconnaît [55]. On distingue l'anergie clonale, la tolérance adaptative et l'épuisement lymphocytaire.

L'anergie correspond à une diminution de la fonction des lymphocytes T qui se caractérise essentiellement par un arrêt de leur prolifération [56]. Principalement décrite dans des expériences de stimulation *in vitro* de clones de lymphocytes T helper 1 (Th1) [57], l'anergie s'installe suite à la reconnaissance de l'antigène par le récepteur T (TCR) sur des cellules présentatrices d'antigène (APC) non activées, n'exprimant pas ou peu CD80 et CD86 [58] ou sur des cellules présentatrices d'antigène non-professionnelles [59]. L'interaction de CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocytes Associated protein 4), exprimé rapidement après l'activation des T, avec ses ligands CD80 et CD86 induit également un arrêt de leur prolifération, une diminution de la production d'IL-2, de l'expression de CD69 ainsi que de l'IL-2Ra (ou CD25) [60]. L'inhibition de la production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4⁺ anergiques est due à une répression transcriptionnelle du gène correspondant [61]. Ils restent cependant capables de produire de l'IFN γ lorsqu'ils sont en contact avec leur antigène [62, 63]. Enfin, la présentation de l'antigène à des T CD4⁺ naïfs par des APCs exprimant des MHCII et ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule -1) en l'absence de tout autre signal de co-stimulation induit aussi un état d'anergie. Un phénomène similaire d'anergie clonale a été montré pour les lymphocytes T CD8⁺. Comme pour les T CD4⁺, cette

anergie s'accompagne d'une inhibition de la prolifération et de la sécrétion d'IL-2 sans effet important sur la production d'IFN γ [64] ou l'activité cytolytique [65]. Il est généralement admis que l'état d'anergie peut être levé lorsque les lymphocytes T sont restimulés en présence d'IL-2 exogène [66].

La tolérance adaptative, encore appelée « *in vivo anergy* », affecte la fonction des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ qui reconnaissent soit un antigène du soi [67, 68], soit un antigène persistant comme c'est le cas lors de certaines infections virales [69] ou bactériennes [70]. La tolérance adaptative, comme l'anergie, s'établit suite à une rencontre du lymphocyte avec son antigène lorsque celui-ci est présenté de manière sub-optimale par des cellules présentatrices d'antigène immatures [71, 72] ou non-professionnelles comme les fibroblastes ou les cellules épithéliales [73]. Elle se traduit par une inhibition de la prolifération et de la sécrétion d'IL-2 [74] ainsi qu'une diminution progressive de l'expression de CD25 [75]. Contrairement à ce qui est décrit pour l'anergie, la tolérance adaptative s'accompagne d'une forte inhibition de la production d'IFN γ , d'IL-4, d'IL-3 et d'IL-10 par les T CD4⁺ [75] ainsi qu'une diminution des récepteurs de chémokines CXCR3, CCR5, et celui de l'IL-12 (IL-12R β) [76]. L'expression de facteurs de transcription tels que Eomes, Tbx21 ou STAT4 est diminuée [76] influençant la voie de signalisation en aval du récepteur de l'IL-12 [77]. Ceci induit chez les T CD8⁺ une baisse de la production de granzyme B et donc une diminution de leur fonction lytique [78]. L'état de tolérance adaptative peut être levé lorsque le T est restimulé en présence d'IL-2 exogène en absence du contexte tolérogène [55].

L'épuisement lymphocytaire est décrit principalement lors d'une infection virale [79], bactérienne ou parasitaire [80] persistante où les lymphocytes T réduisent l'infection sans éliminer complètement le pathogène. Cet état physiologique permet de contrôler une réaction immunitaire excessive, limitant les dommages aux tissus infectés. Pour se développer, l'épuisement lymphocytaire nécessite une rencontre permanente entre l'antigène et le lymphocyte T [81]. Caractérisés pour la première fois dans un modèle d'infection chronique par le virus LCMV (Lymphocytic ChorioMeningitis Virus), les lymphocytes T CD8⁺ « épuisés » conservent leur capacité à reconnaître leur antigène

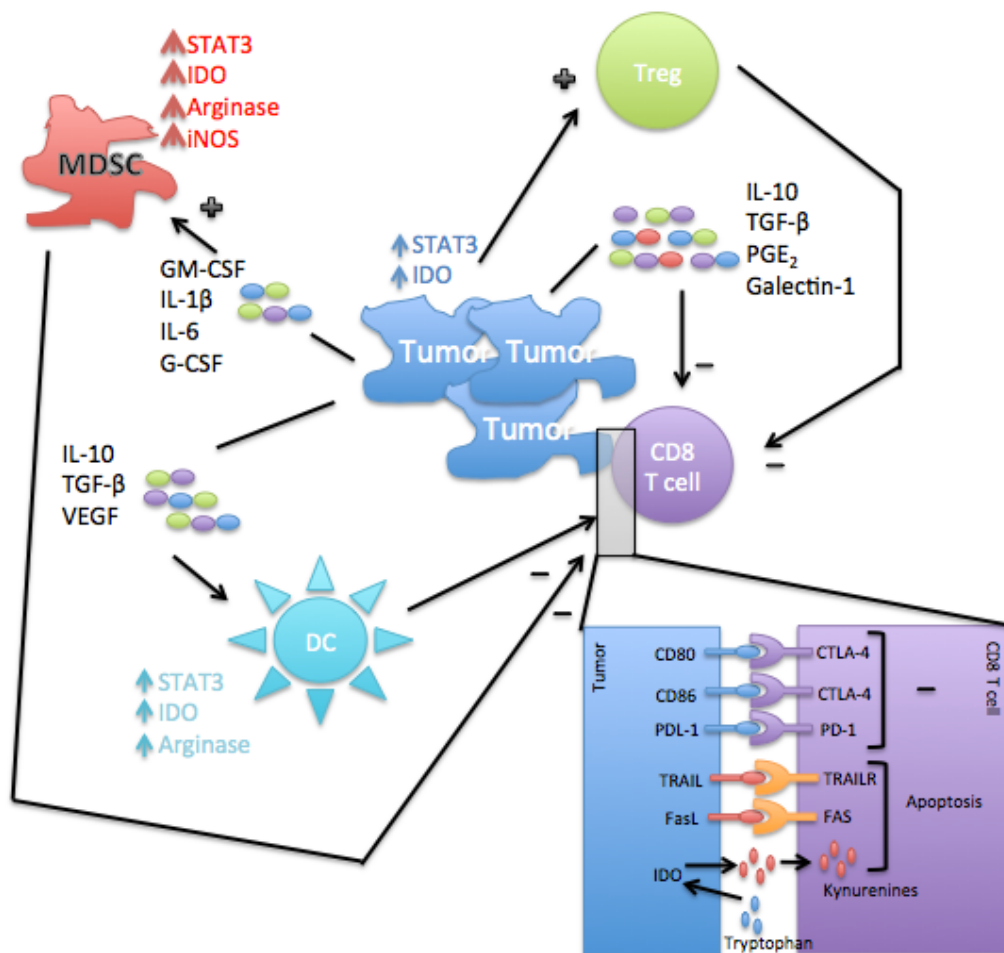
(fixation du tétramère) mais perdent progressivement leur capacité à proliférer, à produire de l'IL-2 ainsi que leur fonction cytolytique [79]. On observe ensuite une diminution de la production du TNF α puis, enfin, celle de l'IFN γ qui peut intervenir plusieurs semaines après la rencontre initiale avec l'antigène et survient peu avant la délétion graduelle de ces T CD8 $^{+}$ épuisés [81]. L'établissement de cet état d'épuisement s'accompagne de l'expression progressive de récepteurs inhibiteurs tels que LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene-3), CTLA-4 et PD-1 (Programmed cell Death 1) [82]. L'interaction de ce dernier avec son ligand, PD-L1, semble avoir un rôle central dans le maintien de l'état d'épuisement [83]. Le même phénomène d'épuisement est observé pour les lymphocytes T CD4 $^{+}$ spécifiques d'antigènes viraux tels que ceux de l'hépatite C [84]. Tant pour les T CD8 $^{+}$ que pour les T CD4 $^{+}$ « épuisés », la récupération fonctionnelle nécessite des traitements associant de l'IL-2 exogène au blocage de PD-1 ou encore le blocage simultané de plusieurs récepteurs inhibiteurs [82, 85, 86].

Selon le type d'infection et le contexte inflammatoire, des lymphocytes T tolérisés ou épuisés se côtoient dans un même environnement à différents stades de paralysie qui peuvent être plus ou moins réversibles [81]. Dans le cas particulier des tumeurs où l'on retrouve une persistance de l'antigène ainsi que le développement progressif d'un environnement immunosuppresseur, la distinction entre T tolérisés ou épuisés est difficile à faire. Les lymphocytes T anti-tumoraux forment une population hétérogène qui montre différents stades de dysfonction, généralement proches de l'état d'épuisement [87]. Ainsi, dans le cas du mélanome humain, les lymphocytes T infiltrant la tumeur peuvent exprimer une ou plusieurs caractéristiques des lymphocytes T épuisés, telles que l'expression de CTLA-4 et PD-1, [88]. De plus, comme Zippelius et al. le démontrent, les lymphocytes T anti-tumoraux peuvent avoir une activité différente selon leur localisation. Ainsi les lymphocytes T anti-Melan.A.A2 présents au niveau de métastases ne produisent pas d'IFN γ , tandis que ceux isolés à partir du sang le font [89].

En plus des mécanismes de tolérance ou d'épuisement liés à la reconnaissance de l'antigène tumoral, différents facteurs présents dans l'environnement tumoral ou de manière systémique contribuent à la paralysie des T anti-tumoraux [90]. Ces différents points de contrôle et mécanismes d'immunosuppression sont représentés dans la Figure 1 et certains seront détaillés dans la suite de ce travail.

Figure 1 : **Stratégie d'immunosuppression utilisée par les cellules tumorales pour échapper au système immunitaire**

Treg = T régulateur, MDSC = Myeloid Derived Suppressor Cell, DC = Dendritic Cells,
Inspirée de Gabrilovich [91]



T régulateurs

T régulateurs dérivant du thymus (nTreg ou tTreg)

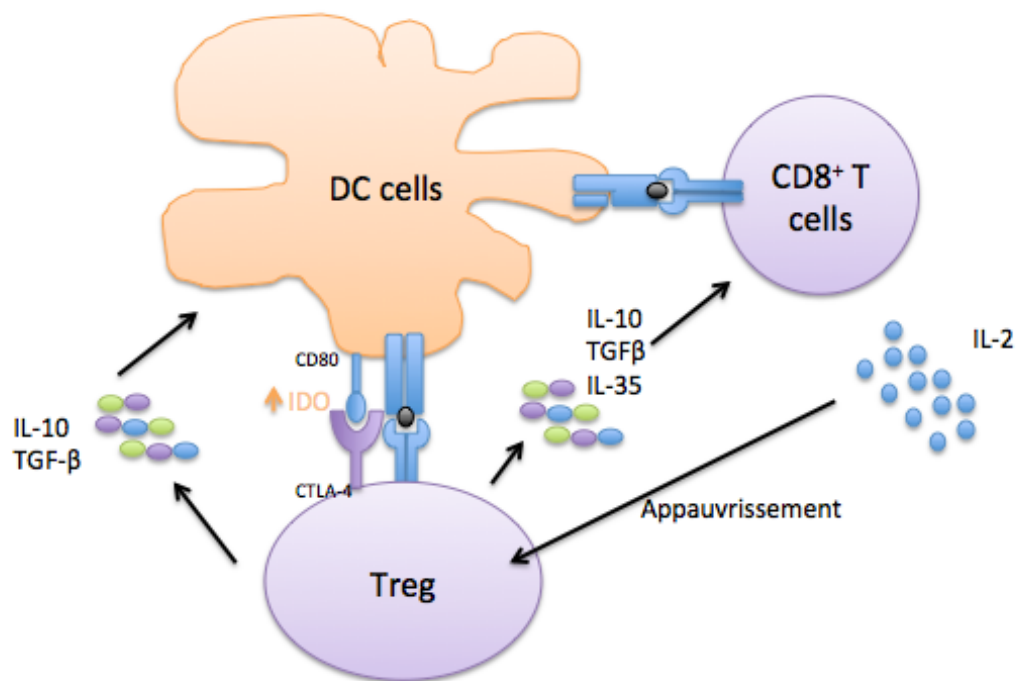
Le développement de maladies auto-immunes chez des souris thymectomisées 2 à 4 jours après la naissance a permis à Sakaguchi et son équipe de décrire une population de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ capables d'induire une tolérance aux antigènes du soi [92]. Représentant 5 à 10% des T CD4⁺ périphériques murins, ces cellules nommées T régulateurs thymiques (tTregs) [93], ou anciennement appelés T régulateurs naturels (nTregs) se caractérisent par l'expression du facteur de transcription FoxP3 qui contrôle leur développement et leur fonction [94]. Ils expriment également de manière constitutive les récepteurs inhibiteurs CTLA-4 [95], GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR) [96], et LAG-3 [97]. Ces différents récepteurs ne sont cependant pas spécifiques des tTregs puisqu'ils peuvent aussi être exprimés transitoirement par des lymphocytes T activés [98] [99] [100] [101]. Une population similaire existe également chez l'homme, chez qui des mutations du gène FoxP3 provoquent un syndrome auto-immun létal rare appelé IPEX (Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked) [102].

Pour exercer leur fonction suppressive, les tTregs doivent reconnaître leur antigène via le TCR, mais leur activité peut se maintenir ensuite en absence d'une nouvelle stimulation du TCR [103]. Ils agissent sur les lymphocytes T effecteurs par contact cellulaire direct, bloquant leur prolifération et leur production d'IL-2 [104], via leur expression membranaire de TGFβ [105]. Ils peuvent également lyser des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ ou des cellules présentatrices par un mécanisme dépendant de la perforine [106] ou du granzyme B [107]. D'autres mécanismes sont également décrits. Ne produisant pas eux-mêmes d'IL-2, indispensable à leur développement, leur survie et leur fonction, les tTregs entrent en compétition avec les T effecteurs activés pour la consommation l'IL-2 [108]. Stimulés de manière optimale, les Tregs sont aussi une source importante d'IL-10 sécrété [109]. Enfin, CTLA-4 joue également un rôle crucial dans la fonction suppressive des Tregs [95]. Chez la souris, la délétion de CTLA-4 au niveau des Tregs uniquement induit une lymphoprolifération fatale. L'expression de CTLA-4 par les Tregs diminue l'expression de

CD80 et CD86 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes permettant de contrôler la stimulation antigénique des lymphocytes T [110]. De plus, il a été montré que l'engagement de CTLA-4 avec ses ligands sur les cellules dendritiques induit chez celles-ci une forte production d'IFN γ qui à son tour induit la transcription du gène de l'IDO (Indolamine 2-3 dioxygénase). Les DCs deviennent alors tolérogéniques [111] (Figure 2).

Figure 2 : **Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs**

Inspirée de Campbell et Meghan [112]



T régulateurs périphériques

Trois autres types de lymphocytes T régulateurs sont également décrits chez l'homme et la souris. Ces T régulateurs se développent en périphérie à partir de lymphocytes T CD4+CD25- conventionnels et peuvent exprimer ou non le marqueur FoxP3 [113].

Les T régulateurs périphériques (pTregs ou anciennement iTreg) reconnaissent des antigènes du soi mais aussi des antigènes étrangers. Ils expriment les mêmes marqueurs que les tTregs (FoxP3, CD25, CTLA-4, LAG-3) [114, 115] et leur fonction immunosuppressive est assurée par les mêmes mécanismes que les tTregs. L'expression différentielle de certains gènes ou facteurs de transcription comme Helios ou Nrp1 (Neuropilin 1) permettant de distinguer les pTregs des tTregs est encore controversée [114, 116, 117, 118].

Tant chez l'homme que chez la souris, l'activation *in vitro* de T CD4⁺CD25⁻ en présence d'IL-10 ou par des DCs traitées à l'IL-10 induit leur différenciation en lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) [119, 120, 121]. *In vivo*, la reconnaissance de l'antigène sur des DCs immatures ou dans un environnement riche en TGFβ et IL-2 favorise aussi la conversion en Tr1 [116, 122]. Les Tr1 contrôlent l'activation de T naïfs ou mémoires tant *in vitro* qu'*in vivo* grâce à leur production d'IL-10 et de TGFβ et suppriment les réponses Th1 et Th2 dirigées contre des pathogènes, des tumeurs ou des antigènes allogéniques [123]. Leur fonction est abolie par l'inhibition de l'IL-10 [124].

Les Th3 sont principalement impliqués dans la tolérance orale. Ils se développent dans les ganglions mésentériques et les tissus lymphoïdes associés au tube digestif. Les Th3 apportent un "help" pour la sécrétion d'IgA [125] mais surtout, via leur production de TGFβ et d'IL-10, ils ont une action suppressive sur les réponses Th1 et Th17 (T helper 17) initiées par la flore intestinale et les antigènes alimentaires [116, 126].

T régulateurs ICOS⁺ (ICOS⁺Treg)

Chez l'homme et la souris on retrouve une 5^{ème} classe des lymphocytes T CD4 régulateurs. Ces lymphocytes Tregs dérivent probablement des tTregs et expriment le marqueur de costimulation inductible ICOS. En plus de sécréter de l'IL-10, ils produisent de l'IL-17 et de l'IFNγ [127]. Cette population est très présente au niveau de la peau et supprime la réponse immunitaire spécifique contre des allergènes et des haptènes [128].

T régulateurs CD8⁺

Enfin, des Tregs CD8⁺ sont également décrits chez l'animal et chez l'homme. Expriment ou non FoxP3, ils n'agissent pas seulement par lyse directe des T effecteurs, via la production de perforine, mais sécrètent aussi des cytokines immunosuppressives comme le TGFβ [129] et l'IL-10 [130].

Une liste non exhaustive des différentes caractéristiques des différentes populations de lymphocytes T régulateurs est reprise dans le Tableau 2.

Tableau 2 : **Nomenclature et caractéristiques des différentes populations de Treg.**

D'après Ray et al [113] et Zhang et al [127]

<i>Population</i>	<i>Marqueurs Spécifiques</i>	<i>Facteur sécrété</i>
tTreg (ou nTreg)	CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4	IL-10, TGFβ, Perforine, Granzyme B
ICOS ⁺ Treg	CD4, CD25, Foxp3, ICOS, CTLA-4	IL-10, IL-17, IFNγ
Treg périphérique		
pTreg (ou iTreg)	CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4	IL-10, TGFβ, Perforine, Granzyme B
Tr1	CD4, CD25	IL-10, TGFβ
Th3	CD4	IL-10, TGFβ
CD8 Treg	CD8, CD25, Foxp3	IL-10, TGFβ, Perforine

Tregs et tumeurs

Le rôle des tTregs dans l'immunité anti-tumorale a été bien décrit dans divers modèles murins: leur déplétion in vivo par injection d'un anticorps anti-CD25 (PC61) induit un rejet complet de 6 des 8 types de tumeurs testées [163]. De même, un traitement par PC61 combiné à une vaccination retarde le développement du mélanome B16 [164].

Il est connu depuis longtemps, chez l'homme, que de nombreuses tumeurs sont infiltrées par un nombre important de Tregs FoxP3+, leur abondance étant généralement corrélée avec un stade plus avancé et un mauvais pronostic [165, 166]. Ainsi, chez de nombreux patients atteints de mélanome, on observe une augmentation du nombre de Tregs dans la circulation sanguine [167]. Ils se retrouvent aussi dans les tumeurs, les ganglions drainants ainsi que dans les métastases [168, 169]. L'origine des Tregs CD4 FoxP3 infiltrant les tumeurs varie ; ils peuvent résulter soit de la conversion de T conventionnels en pTregs sous l'effet du TGFβ présent dans l'environnement tumoral soit d'une amplification de tTregs qui reconnaissent des antigènes tumoraux [170-172]. Ces Tregs peuvent reconnaître différents antigènes tels que l'antigène LAGE-1 [131] ou gp100 [132]. De plus il a été montré que l'immunisation avec un peptide tel que MAGE-A3 pouvait induire l'expansion des Tregs [133]. Dans le cas du mélanome, il a également été montré que les Tregs suppriment la réponse anti-tumorale grâce à la production d'IL-10 ou de TGFβ qui agit sur la population de lymphocytes T CD4 ou CD8 en limitant par exemple la production d'IFNγ [134] [135]. De plus, les Tregs peuvent induire la mort des lymphocytes T CD8 ou des NK grâce à un contact cellulaire et à la libération de granzymes B et de perforine [136].

Enfin, il a été montré chez des patients atteints de mélanome, que l'administration de forte dose d'IL-2 comme protocoles d'immunothérapie induit dans certains cas l'expansion dans le sang d'une population des lymphocytes ICOS+Treg. L'efficacité du traitement par l'IL-2 semble être liée à l'absence de ICOS+Treg [137].

Cytokines immunosuppressives

Une réponse immunitaire efficace peut être inhibée par des cytokines immunosuppressives sécrétées dans l'environnement tumoral. Ces facteurs peuvent être exprimés soit par les cellules tumorales soit par les cellules inflammatoires dont les lymphocytes T régulateurs.

IL-10

Découverte en 1989 par l'équipe de Tim Mossman, l'interleukine-10 (IL-10) a été d'abord décrite comme une cytokine sécrétée par les lymphocytes T helper de type 2 (Th2), inhibant la production d'IFN γ par les lymphocytes Th1 [134]. Il a été montré plus récemment que l'IL-10 pouvait être produite, entre autres, par les monocytes/macrophages [138], les cellules dendritiques [139], les lymphocytes T régulateurs de type 1 [115] ainsi que les cellules tumorales [140] dont le mélanome [140].

Les lymphocytes et APC sont les premières cibles de l'IL-10. En bloquant la différenciation des monocytes/macrophages, l'IL-10 induit une diminution de l'expression des MHC de classe II [141], des molécules de costimulation CD80 et CD86 ainsi que de la molécule d'adhésion ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1)[142] limitant leur capacité à activer les lymphocytes T [143]. L'IL-10 diminue l'expression des MHC de classe I et II par les cellules tumorales [144], ainsi que l'expression des protéines TAPs, et donc la présentation des antigènes et leur reconnaissance par les lymphocytes T [145]. L'IL-10 favorise également le développement de lymphocytes Tr1 (voire chapitre suivant) [146].

Souvent présente dans le sérum de patients atteints d'une maladie inflammatoire [147] ou d'un cancer [148], l'IL-10 semble jouer un rôle important dans la régulation négative d'une réponse immunitaire.

TGF β

Le TGF β (Transforming Growth Factor β) est une cytokine pléiotropique essentielle au maintien de l'homéostasie lymphocytaire. En effet, une mutation dans le gène codant pour le TGF β 1 induit chez la souris une accumulation excessive de cellules inflammatoires pouvant provoquer leur mort précoce [149]. Il est produit par de nombreux types de cellules dont les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ [150], les lymphocytes B [151], les monocytes/macrophages [152] ou encore les cellules tumorales dont les mélanomes [153].

Le TGF β affecte la prolifération, la différenciation, la migration et la survie de différents types de cellules du système immunitaire inné ou adaptatif [154]. Il diminue l'expression d'IL-2 par des lymphocytes T activés et donc leur prolifération [155], la production d'IFN γ et de perforine par les T CD8+ [135], la fréquence et l'activité cytolytique des T CD8 spécifiques de tumeurs [156]. Le TGF β inhibe l'expression de Tbet et Gata-3 qui régulent la différenciation des T CD4 en Th1 et Th2 mais au contraire favorise l'expression de FoxP3, ce qui induit la différenciation en Tregs [157]. Il diminue également la production d'IFN γ par les NK (Natural Killer) ainsi que leur activité lytique [158] [159]. Le TGF β a un effet profond sur la présentation des antigènes. Il diminue la maturation des DCs, inhibant leur expression de CD80 et CD86, leur production d'IL-12, de TNF α et d'IFN α [160] ; la présentation de l'antigène par des DC immatures induisant alors la tolérance chez les lymphocytes T [71]. Il peut aussi inhiber la migration des DCs limitant le transfert de l'antigène vers les ganglions drainants [161]. Il pourrait également induire directement l'apoptose des DCs [162].

Au niveau des tumeurs, en plus de ses fonctions immunosuppressives, le TGF β peut favoriser la croissance et le développement de métastases. Il induit l'expression de différents facteurs de transcription impliqués dans l'« epithelial-to-mesenchymal transition » (EMT) tels que Snail [163], Twist [164], et Slug [165]. De plus, à des stades avancés de carcinomes, le TGF β favorise l'expression de métalloprotéinases (MMP) telles que MMP-2 et MMP-9 [166]. Ces deux MMPs contribuent à la prolifération des cellules tumorales en augmentant la biodisponibilité en facteurs de croissance tels que l'IGF (Insulin Growth Factor) [167] ou le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [168]. De plus, MMP-9 favorise le développement de métastases en facilitant EMT [169].

En plus d'influencer la différenciation des lymphocytes T CD4 en Tregs et d'induire la production d'IL-10 ou de TGF β , les tumeurs ont la capacité d'affecter la myélopoïèse et d'induire l'expansion d'une population de cellules myéloïdes immatures qui présentent une activité immunosuppressive. Cette population, appelée MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cell) a largement été décrite chez l'homme et chez la souris.

MDSC

Les MDSC, principalement décrites pour leurs fonctions immunosuppressives sur les lymphocytes T CD8⁺ [170], sont constituées d'un mélange hétérogène de macrophages, de granulocytes, de DCs immatures et autres cellules myéloïdes à des stades précoces de différenciation (IMC _ Immature myeloid Cell). Chez des individus sains, les IMCs sont produites par la moëlle osseuse et se différencient rapidement au niveau des organes périphériques [171]. Chez des patients atteints d'un cancer [172], d'une infection virale ou bactérienne [173], d'une parasitose [174, 175], ou encore après un traumatisme [176], la différenciation des cellules myéloïdes est bloquée ce qui mène à l'apparition de la population de MDSC [177].

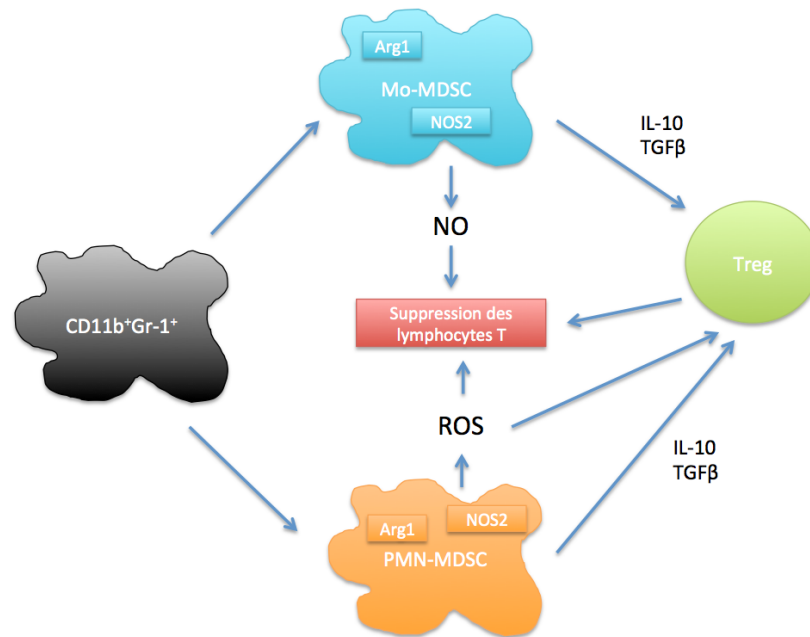
Tant chez l'homme que chez la souris porteuse d'une tumeur, les MDSCs s'accumulent au niveau de la moëlle osseuse, des organes lymphoïdes secondaires et dans la tumeur [178]. Différents facteurs inflammatoires, tels que l'IL-1 β [179], la PGE-2 (prostaglandine E₂) [180], le GM-CSF (granulocyte/macrophage-Colony-Stimulating Factor) [181], ou encore le VEGF [182] sont souvent cités comme induisant l'accumulation des MDSCs [183]. Toutefois, le recrutement de cellules myéloïdes dans l'environnement tumoral n'est pas suffisant pour induire une immunosuppression, il faut aussi que les MDSC soient activées. Elles peuvent l'être par l'IFN γ produit par les lymphocytes T activés permettant, par exemple, d'activer la production d'IFN γ et d'IL-13 par les MDSCs elles-mêmes ce qui induit l'expression de l'Arginase I et de Nos2 (Nitric oxide synthase 2) [184] (Figure 3).

Deux types de MDSCs sont décrits chez la souris, les MDSCs de type granulocytaire (PMN-MDSC ; CD11b⁺Gr-1⁺Ly6G⁺) qui libèrent des ROS (Reactive Oxygen Species) sans production d'oxyde nitrique (NO[•]) et les MDSCs de type macrophagique (MO-MDSC ; CD11b⁺Gr-1⁺Ly6C⁺) qui libèrent de l'oxyde nitrique sans production de ROS [185] (Figure 3). L'Arginase I peut être exprimée par les deux types de MDSCs [186]. Les MDSCs tolèrent les lymphocytes T en favorisant la nitration du TCR [187] ou en inhibant l'expression de CD3 ζ [188]. La production de NO[•] par les MO-MDSC peut induire une diminution de la

phosphorylation de CD25 exprimé par les lymphocytes T, bloquant l'effet prolifératif de l'IL-2 [189] tandis que la présence de ROS rend les T incapables de répondre à un antigène en diminuant le flux de calcium [190]. La production de TGF β ainsi que d'IL-10 par les MDSCs, de même que la production de ROS par les PMN-MDSCs, peut également induire le développement de Tregs [191, 192]. Les MDSCs contribuent également à la baisse de concentration de certains acides aminés comme l'Arginine, le Tryptophane et la Cystéine, ce qui diminue la fonction des lymphocytes T (voir ci dessous). Enfin, les MDSC n'affectent pas uniquement les cellules du système immunitaire. L'expression de la MMP9 par les MDSCs augmente la biodisponibilité du VEGF pour les cellules endothéliales et donc l'angiogénèse tumorale [193].

Figure 3 : **Mécanisme de recrutement, d'activation et de suppression des différentes populations de cellules myéloïdes.**

Arg1 = Arginase 1, NOS2 = Nitric Oxyde Synthase 2, Treg = Lymphocyte T régulateur, NO = Oxyde Nitrique, MO-MDSC = MDSC de type macrophagique, PMN-MDSC = MDSC de type granulocytaire. Inspiré de Gabrilovich [183]



Comme pour les facteurs immunosuppresseurs, la réponse immunitaire peut être altérée par la privation de certains acides aminés. Les enzymes responsables de la privation d'acides aminés peuvent être exprimés par les cellules tumorales elles-mêmes ou par les cellules dendritiques, les macrophages ou les cellules myéloïdes présents dans l'environnement tumoral.

Privation en acides aminés

Au-delà de leur fonction en tant que composants des protéines, certains acides aminés jouent un rôle dans la régulation de divers mécanismes tels que la croissance [194], la reproduction [195] ou le système immunitaire [196]. Dénommés acides aminés fonctionnels, ils incluent l'Arginine, la Cystéine, la Glutamine, la Leucine, la Proline et le Tryptophane [197]. La privation en Arginine, Tryptophane et Cystéine a des effets immunosuppresseurs qui peuvent contribuer à l'échappement tumoral.

L-Arginine

La L-Arginine est un acide aminé non-essentiel qui peut être synthétisé au niveau de l'épithélium intestinal à partir de la citrulline [198]. La L-Arginine est un des maillons du cycle de l'urée qui participe à la détoxification de l'organisme en permettant la formation d'urée à partir d'ammoniac [199]. L'absence de L-Arginine influence de manière négative la réponse immunitaire dirigée contre des pathogènes ou les tumeurs [195]. En effet, les cytokines inflammatoires, telles que IL-4 ou l'IL-13 qui peuvent être produites par les lymphocytes Th2 [200] ou les MDSCs elles-mêmes augmentent l'expression du transporteur cationique, CAT2B [201] à la membrane des macrophages ou des MDSCs [188] ce qui appauvrit le milieu en L-Arginine. Cette diminution a pour première conséquence d'augmenter l'activation de la kinase GCN2, provoquant l'arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T [202]. Les catabolites de l'Arginine influencent également la réponse immunitaire. Dans les macrophages ou les MDSCs, la L-Arginine peut être dégradée principalement par deux types d'enzymes : l'Arginase 1 (ARG1) et iNos [198].

L'ARG1 est une enzyme cytosolique constitutivement exprimée au niveau des hépatocytes pour réguler le cycle de l'urée. Elle peut être induite dans les cellules myéloïdes par le TGF β [203], le GM-CSF [204] ou l'IL-10 [205].

iNOS est induite dans différents types de cellules, dont les cellules myéloïdes, par un grand nombre de cytokines inflammatoires, dont l'IFN γ , l'IL-1 α ou le TNF α [206]. Le NO $^{\cdot-}$ produit suite à la dégradation de la L-Arginine par iNOS dans les MO-MDSC diffuse de manière passive à travers la membrane vers et dans les cellules avoisinantes [207, 208]. La présence de NO $^{\cdot-}$ au niveau du cytoplasme des lymphocytes T modifie différentes molécules de la voie de signalisation de l'IL-2. Par exemple, NO $^{\cdot-}$ oxyde la kinase JAK3, une des premières kinases de la voie de signalisation de l'IL-2R, provoquant une perte de son activité [189]. De plus, la présence de NO $^{\cdot-}$ réprime l'expression du facteur de transcription Yin-Yang 1 par les lymphocytes T induisant une surexpression de la protéine Fas ce qui les sensibilise à l'apoptose induite par FasL [209].

Lorsque la concentration intracellulaire en L-Arginine est trop faible, iNOS en combinaison avec l'Arginase I [210], produit le superoxyde O $_2^{\cdot-}$ [211] qui interagit avec NO $^{\cdot-}$ ou H $_2$ O pour former des ROS (Reactive Oxygen Species) dont de l'H $_2$ O $_2$ ou du peroxynitrite (ONOO $^{\cdot-}$) [212, 213]. Les ROS agissent sur la fonction des lymphocytes T par deux mécanismes : ils augmentent la nitration des TCR ce qui diminue l'activation des lymphocytes T [214]; ils augmentent l'expression de FasL et diminuent l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2, ce qui sensibilise les T à l'apoptose [215]. Les ROS peuvent également modifier des protéines déjà transcrites _ H $_2$ O $_2$ peut induire la dimérisation des protéines Bax favorisant ainsi l'entrée en apoptose par la voie intrinsèque [216].

L-Tryptophane

Le L-Tryptophane est un acide aminé essentiel [217]. Utilisé dans la synthèse des protéines, il est également un intermédiaire de la production de la sérotonine et de la mélatonine [218]. La dégradation du L-Tryptophane chez les mammifères se fait principalement par la voie de la Kynurenine [219]. La première étape consiste en l'ajout d'oxygène transformant le L-Tryptophane en N-formyl-Kynurenine qui sera ensuite dégradée en Kynurenine [220]. Cette étape initiale et limitante est assurée par deux enzymes différentes, l'IDO (l'Indoléamine 2,3-dioxygénase), et le TDO (Tryptophane 2,3-dioxygénase).

Indoléamine 2,3-dioxygénase

L'IDO est induite par l'IFN γ dans différents types de cellules dont des macrophages et certaines cellules dendritiques. Chez l'homme, on détecte son expression dans les cellules endothéliales du placenta et du poumon, dans les cellules épithéliales du tractus génital féminin et dans certaines cellules dendritiques matures présentes au niveau des tissus lymphoïdes [221].

Le rôle immunosuppresseur de l'IDO a été mis en évidence par Munn et Mellor montrant que, chez la souris, l'IDO avait un rôle essentiel dans la tolérance foeto-maternelle. En diminuant la concentration locale en Tryptophane, l'IDO bloquait la prolifération des lymphocytes T dirigés contre les alloantigènes du fœtus [222]. De même, l'expression de l'IDO par des macrophages et des cellules dendritiques, chez l'homme et la souris, inhibe la prolifération des lymphocytes T particulièrement sensibles à la privation en Tryptophane qui induit un signal de stress cellulaire initié par l'activation de la kinase GNC2, ce qui cause leur arrêt en phase G1 du cycle cellulaire [223].

Des catabolites du Tryptophane ont été également impliqués dans l'immunosuppression induite par l'IDO. En effet la Kynurenine peut interagir avec le facteur de transcription AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) présent dans les lymphocytes T ou les

cellules dendritiques. *In vitro*, l'interaction de la Kynurénine avec AhR induit l'expression de FoxP3 dans des T CD4 naïfs et donc la différenciation en Tregs [224]. Il a également été montré que les produits de dégradation de la Kynurenine (3-Hydroxyanthanilic et Quinolic Acid) pouvaient induire l'apoptose des lymphocytes T Th1 sans activation des récepteurs de mort cellulaire [225].

L'IDO est détectée dans de nombreuses tumeurs humaines. Elle peut être exprimée par des cellules présentatrices d'antigène ou des cellules dendritiques présentes dans des zones riches en cellules inflammatoires, mais également par des MDSCs [226]. Mais surtout, l'IDO est exprimée de manière constitutive par les cellules tumorales elles-mêmes appartenant à de nombreux types histologiques différents. Dans le modèle murin P815, il a été montré que l'expression de l'IDO par les cellules tumorales leur permettait de résister au rejet immunitaire quand elles étaient injectées dans des souris vaccinées contre l'antigène tumoral P1A [227].

Tryptophane 2,3-dioxygénase

TDO, la deuxième enzyme catalysant la dégradation du Tryptophane par la voie de la Kynurénine est fortement exprimée dans le foie et régule la concentration systémique en Tryptophane. L'effet immunosuppresseur de TDO dans le foie pourrait contribuer à la tolérance vis-à-vis d'allogreffes observée après transplantation hépatique [228]. Une faible expression de TDO est également observée au début du développement embryonnaire, au niveau de l'endomètre et du placenta où elle contribuerait à la tolérance foeto-maternelle [229, 230].

De même que l'IDO, TDO est exprimée dans une proportion importante de tumeurs humaines différentes et particulièrement dans les carcinomes hépatiques [231]. Ici encore, le catabolisme du Tryptophane initié par TDO a un effet profondément immunosuppresseur sur les lymphocytes T, empêchant le rejet d'une tumeur murine exprimant TDO dans des souris pré-immunisées [231].

Cystéine

La Cystéine est un acide aminé non-essentiel qui peut être synthétisé à partir de la Méthionine ou de la Cystine. C'est l'acide aminé limitant pour la synthèse du glutathion indispensable au passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire [232]. Les cellules dendritiques et les macrophages expriment la cystathionase qui permet la transformation de la Méthionine en Cystéine ainsi que le transporteur membranaire X_c^- qui transfère la Cystine du milieu extracellulaire vers le cytoplasme permettant sa réduction en Cystéine [233]. Ces cellules exportent alors la Cystéine synthétisée par un transporteur ASC (Alanine-Serine-Cystein transporter) rendant l'acide aminé accessible aux lymphocytes T [234]. En effet, bien que la Cystéine soit indispensable à la prolifération des lymphocytes, ceux-ci sont incapables de la synthétiser [235].

En 2010, il a été décrit par l'équipe de Suzanne Ostrand-Rosenberg [236] que les MDSCs exprimaient le transporteur membranaire X_c^- mais pas le transporteur neutre ASC. Les MDSC appauvrissent donc le milieu en Cystéine, bloquant la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 [236]. Dans cette même étude, ils montrent que la concentration plasmique en Cystéine diminue en présence d'une tumeur et que l'ajout de Cystéine restaure partiellement la prolifération des lymphocytes T lorsqu'ils mis en culture avec des MDSCs.

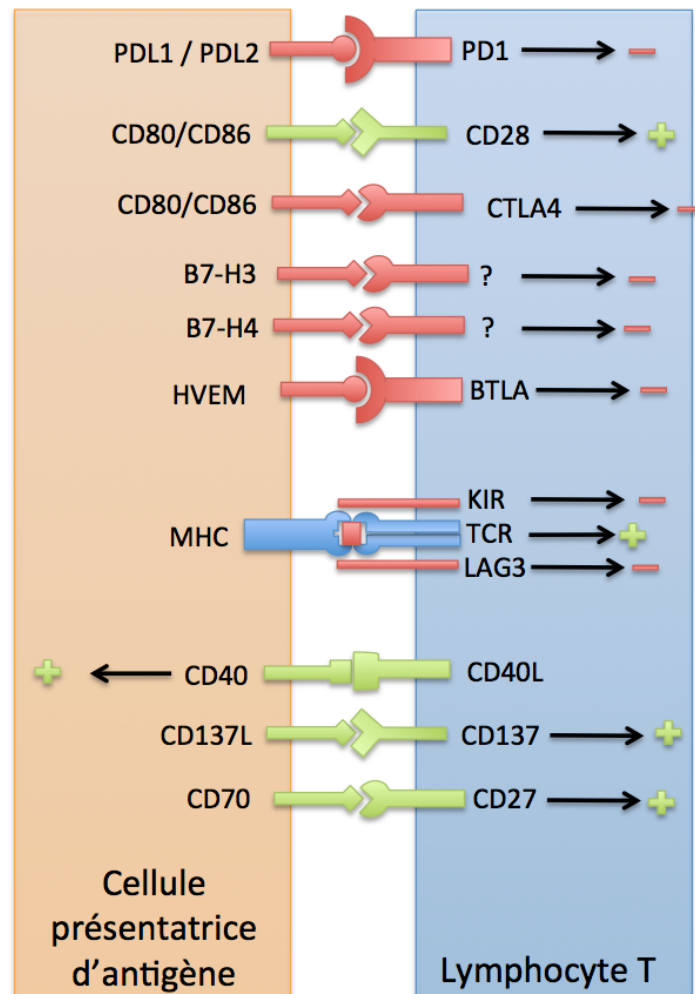
Molécules de co-stimulation négative

L'activation des lymphocytes T nécessite la reconnaissance de l'antigène par son récepteur TCR et la présence d'un signal de co-stimulation positive, transmis par l'interaction entre CD80 et CD86 exprimé par les cellules présentatrices d'antigène et CD28 exprimé par les lymphocytes T [237]. Des molécules de co-stimulation négative sont également exprimées par les cellules présentatrices d'antigène, qui interagissent avec leurs ligands sur les lymphocytes T induisant leur inhibition [238]. Le signal inhibiteur limite l'ampleur et la durée des réponses immunitaires lors d'infections virales, bactériennes ou dans le cas de cancers permettant de maintenir les lymphocytes T dans un état de tolérance

adaptative [239] [240] (Figure 4). Les molécules de co-stimulation négative les plus décrites sont CTLA-4 [241] et PD-1 [242].

Figure 4 : **Représentation des différents points de contrôle de l'activation des lymphocytes T.**

PDL-1 = Programmed cell death protein Ligand -1, PDL-2 = Programmed cell death protein Ligand -2, PD1 = Programmed cell death, CTLA-4 = cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4, HVEM = Herpevirus entry mediator, BTLA = B and T lymphocyte attenuator, KIR = Killer cell Immunoglobulin like Receptor, TCR = T Cell Receptor, LAG3 = Lymphocyte Activation Gene 3. D'après Pardoll [51]



CTLA-4

Décrit pour la première fois en 1987, CTLA-4 comme CD28 fait partie de la superfamille des immunoglobulines [243]. Une délétion dans le gène murin *ctla-4* induit une accumulation progressive de lymphocytes T dans différents organes suggérant un rôle régulateur négatif de CTLA-4 dans l'homéostasie de la réponse immunitaire [244]. Des homologies structurales entre CTLA-4 et CD28, surtout au niveau de la région extracellulaire, suggèrent l'existence d'une relation fonctionnelle entre les deux molécules [245]. CTLA-4 et CD28 reconnaissent d'ailleurs les mêmes ligands, CD80 et CD86. Par contre, si CD28 peut être exprimé par les lymphocytes T naïfs, CTLA-4 n'est détecté qu'après activation [246].

L'interaction de CTLA-4 avec CD80 et CD86, même en présence de CD28, induit un arrêt de la prolifération, de la différenciation et de la production d'IL-2 par les lymphocytes T activés [247]. Elle diminue également la phosphorylation du TCR ζ [248] limitant le recrutement des TCR au niveau des synapses immunologiques [249]. Enfin, CTLA-4 a un rôle dans la régulation du catabolisme du Tryptophane et donc dans la tolérance périphérique ou l'immunosuppression. Exprimé de manière constitutive par les Tregs, il interagit avec les ligands exprimés par les cellules dendritiques, ce qui induit une forte production d'IFN γ par celles-ci responsable de l'induction d'IDO [111, 250].

PD-1 / PD-L1

Initialement décrit sur les lymphocytes T qui entrent en apoptose [242], PD-1 est exprimé sur les lymphocytes T et B ainsi que sur les monocytes suite à leur activation [251]. PD-1 est également exprimé sur une fraction des thymocytes immatures doubles négatifs. Des études menées dans des souris PD-1 KO ont montré que PD-1 régulaît de manière négative la sélection β et modifiait la sélection positive des T dans le thymus, ce qui altérerait le répertoire des lymphocytes T matures [252]. La sélection β permet de réguler la clonalité

des TCRs au niveau de la chaîne β du TCR. Avant le réarrangement de la chaîne α du TCR, un pré-complexe TCR est formé. Ce pré-complexe est constitué d'une chaîne β réarrangée, une chaîne α immature et une molécule CD3. Si le réarrangement de la chaîne β permet une sélection du thymocyte, le réarrangement de la chaîne α du TCR s'effectuera conduisant à la production de thymocyte doublement positif, sinon le lymphocyte T entrera en apoptose [253]. De plus, les souris C57Bl/6 PD-1^{-/-} développent avec l'âge un syndrome prolifératif proche du lupus associant une glomérulonéphrite et de l'arthrite. Ces résultats suggèrent que PD-1, en plus de son rôle au niveau du thymus, est impliqué dans le maintien de la tolérance périphérique, agissant comme régulateur négatif de la réponse immune [254].

Le récepteur PD-1 possède dans sa région intracellulaire un domaine ITIM (Immunoreceptor tyrosine bases inhibitory motif) et un domaine ITSM (immunoreceptor Tyrosine Based Switch motif) qui permettent de recruter la phosphatase SHP2 (SRC homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2) [255]. Dans les lymphocytes T CD4, SHP2 déphosphoryle les protéines telles que Zap70 ou la PI3K impliquées dans la voie de signalisation du TCR conduisant à l'activation des lymphocytes T [256] ainsi qu'à leur production d'IL-2 [257] ou d'IFN γ [258]. Le même effet inhibiteur de PD-1 a été montré pour les lymphocytes T CD8 [259].

PD-L1 et PD-L2 sont les deux ligands naturels de PD-1. Leur expression sur les macrophages et les DCs est augmentée suite à leur maturation [251]. Une expression de PD-L1 sur les lymphocytes T activés a également été décrite [260]. *In vivo*, le blocage de PD-L1 par un anticorps permet de restaurer la fonction des lymphocytes T épuisés lors d'une infection chronique [83].

De nombreuses tumeurs humaines dont les mélanomes expriment PD-L1 [261]. Chez l'homme, il a été montré que des lymphocytes T spécifiques de l'antigène NY-ESO-1 augmentaient leur expression de PD-1 et que cette expression corrélait avec leur incapacité à s'activer [262, 263]. Lorsque ces T CD8 anti-NY-ESO-1 épuisés étaient restimulés *in vitro* en présence de cellules présentatrices d'antigène exprimant PD-L1 ou d'un mélanome PD-

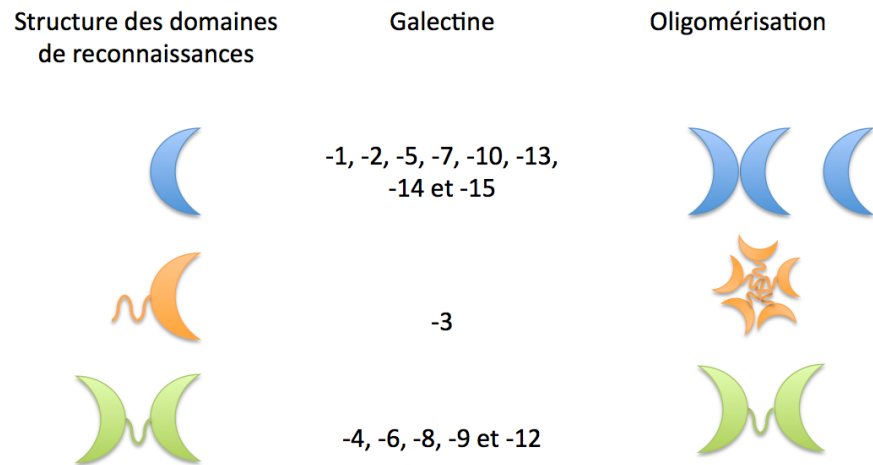
L1⁺ et des anticorps bloquant PD-L1, on observait une augmentation de leur prolifération et de leur production de cytokines [262]. De plus, le traitement avec des anticorps anti-PD-1, tels que le lambrolizumab, permet de prolonger la survie des patients atteints de mélanome [264].

Les galectines

Les galectines font partie de la famille des lectines. Chez les mammifères on dénombre actuellement 15 galectines [265] qui peuvent se retrouver soit dans le milieu extracellulaire, soit être associées à une membrane ou encore être intracellulaires [265]. La structure de toutes les galectines comporte un domaine très conservé de 135 acides aminés impliqués dans la liaison aux glucides, appelé domaine de reconnaissance des hydrates de carbone. Les galectines ont été classées en deux groupes, les galectines qui expriment un domaine de reconnaissance et celles qui en expriment deux en tandem (Figure 5). Les galectines-1, -2, -5, -7, -10, -13, -14 et -15 peuvent rester sous forme de monomère ou former des dimères symétriques. Les galectines-4, -6, -8, -9 et -12 forment des tandems reliés entre eux par une région contenant 70 acides aminés, tandis que la galectine-3 forme des pentamères. Nous détaillerons dans ce travail uniquement les trois galectines qui semblent jouer un rôle dans l'entrée en apoptose des lymphocytes T.

Figure 5 : Classification des galectines selon le nombre de domaine de reconnaissance et leur oligomérisation.

D'après Rabinovich [265]



Galectine – 1

La Galectine-1 est exprimée par différentes cellules dont les fibroblastes, les cellules musculaires striées et lisses, les neurones, les cellules endothéliales, les macrophages et les lymphocytes T. Différentes tumeurs expriment également la Galectine-1 telles que des adénocarcinomes utérins [266], ou des mélanomes [267]. Toutefois, une grande partie de la Galectine-1 trouvée dans les tissus tumoraux provient de son expression par le stroma, comme c'est le cas pour le cancer du colon [268], ou les carcinomes pancréatiques [269]. Exprimée également de manière constitutive au niveau de l'épithélium thymique, la Galectine-1 se lie aux thymocytes humains et jouerait un rôle dans la sélection des lymphocytes T. En effet, l'exposition *in vitro* de thymocytes humains à la Galectine-1 induit l'apoptose de deux sous-populations de cellules immatures CD4^{lo}CD8^{lo}, négatives ou faiblement positives pour CD3, correspondant aux thymocytes non sélectionnés ou engagés dans la sélection négative [270].

Un rôle plus indirect a également été décrit. La Galectine-1 augmenterait l'apoptose des lymphocytes T humains activés médiée par Fas/FasL, en induisant progressivement une activation de la caspase 8, 9 et 3. Elle augmenterait également l'expression de Fas par

les T humains au repos et induirait des changements dans la morphologie des mitochondries menant à leur fission [271]. D'autres études, par contre, montrent que la Galectine-1 induit bien l'externalisation de la phosphatidylsérine par des T humains activés mais sans entraîner l'apoptose [272]. *In vivo*, il a été montré que la délétion de la Galectine-1, grâce à un cDNA antisens, dans la lignée de mélanome B16 permet d'augmenter la survie des souris par rapport à un groupe injecté avec la lignée wild-type. De plus, un rejet complet des tumeurs B16 Gal-1 KO est observé dans la majorité des souris, mais uniquement si les lymphocytes T CD4 et CD8 sont présents. Restimulés *in vitro*, les lymphocytes T provenant des ganglions drainant les tumeurs B16 Gal-1 KO expriment plus d'IFN γ et prolifèrent plus que ceux provenant d'une souris porteuse d'une tumeur wild-type [273].

Un rôle immunomodulateur et anti-inflammatoire a été aussi décrit pour la Galectine-1. *In vitro*, elle induit un shift dans la production de cytokines par des T humains activés à la PHA (PhytoHemAgglutinine) qui secrètent moins d'IFN γ mais davantage d'IL-10 [272]. *In vivo*, l'injection de fibroblastes transfectés exprimant une forte quantité de Galectine-1 ou l'administration de Galectine-1 recombinante diminue les symptômes cliniques et histologiques de l'arthrite à collagène (CIA) induite chez les souris DBA/1. L'injection de Galectine-1 diminue l'inflammation en induisant un shift dans la réponse TH1 pathologique vers une réponse Th2 : après restimulation *in vitro*, les lymphocytes des ganglions drainants secrètent moins d'IFN γ mais beaucoup plus d'IL-5. Leur sécrétion d'IL-2 est également réduite. On observe aussi une diminution de la quantité totale d'immunoglobulines anti-collagène ainsi qu'une modification de leur isotype (moins d'IgG2a pathogéniques et plus d'IgG1). Dans ce modèle, la Galectine-1 a aussi clairement un rôle pro-apoptotique. En effet l'apoptose induite par la restimulation antigénique des T est plus importante s'ils proviennent des ganglions de souris traitées à la Galectine-1 que de souris contrôles, ce qui pourrait expliquer en partie les effets thérapeutiques *in vivo* [274].

Galectine-3

Exprimée par les lymphocytes T, B, les NK, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les fibroblastes, la Galectine-3 est également produite par de nombreuses cellules tumorales dont les mélanomes [275]. Des activités pro ou anti-apoptotiques ont été décrites [276-278].

In vitro, la Galectine-3, comme la Galectine-1 diminue la viabilité des thymocytes : l'ajout de Galectine-3 sur des thymocytes humains induit la délétion des populations double positives ou double négatives, montrant un rôle distinct de la Galectine-1 [276]. De plus il a été montré que la culture de lymphocytes T humains activés en présence de Galectine-3 induit l'entrée en apoptose des ces cellules, caractérisée par l'externalisation des PS et la fragmentation de l'ADN [272]. La même observation est faite pour différentes lignées T tumorales humaines [276]. Par contre, d'autres études mettent en évidence un rôle anti-apoptotique de la Galectine-3. Ainsi la transfection de la Galectine-3 dans une lignée de leucémie T humaine confère à ces cellules une résistance à l'apoptose induite par des anticorps anti-Fas. La Galectine-3 qui présente des homologies de séquence avec Bcl-2 interagirait avec celle-ci pour inhiber l'apoptose [278]. Transfectée dans la lignée humaine BT549 dérivée d'une tumeur ovarienne, elle inhibe l'apoptose induite par différents stimuli comme des agents utilisés en chimiothérapie ou la privation en facteurs de croissance. Elle agirait en s'associant avec la membrane mitochondriale favorisant le maintien de son intégrité et limitant le relargage du cytochrome C [279].

La Galectine-3 a également un effet profond sur l'activité des lymphocytes T. Pierre van der Bruggen et son équipe ont montré que la galectine-3 jouait un rôle important dans l'absence de fonctionnalité des TILs infiltrant différents types de tumeurs dont les carcinomes ovariens. En formant un lattis qui immobilise les TCRs à la surface des lymphocytes T, elle empêcherait leur colocalisation avec les molécules CD8 au niveau de la synapse immunitaire. S'ils traitent *ex vivo* ces TILs avec des ligands de la galectine-3, comme les sucres LacNac, le GCS-100 ou le GM-CT01, ou encore avec un anticorps anti-Galectine-3, capables de détacher la galectine-3 de la surface des lymphocytes T, ils

observent une restauration de la production d'IFN γ , une augmentation de celle de l'IL-2 et du TNF α . Ils montrent également une réassociation entre le TCR et CD8, une récupération de l'activité cytotoxique et de la dégranulation des TILs [280-282]. Ce rôle inhibiteur de la Galectine-3 sur la réponse immunitaire a été clairement illustré *in vivo* dans le modèle murin du mastocytome P815. Des souris injectées avec P815, puis vaccinées 4 jours plus tard par l'administration d'adénovirus recombinant exprimant P1A, l'antigène tumoral majeur de P815, développaient toutes des tumeurs. La vaccination n'avait pas d'effet significatif sur la croissance des tumeurs mais prolongeait légèrement la survie de la souris. Si, en plus de la vaccination anti-P1A, un traitement avec du GCS-100, injecté 3x semaines était entamé au jour 10, en présence de tumeurs déjà nettement palpables, un rejet complet et une survie à long terme étaient observés chez 50% des animaux. L'inhibition de la Galectine-3 favorise donc la réponse CTL anti-P1A menant au rejet [280].

En plus de son rôle inhibiteur sur les réponse T, la Galectine-3 aurait un rôle pro-tumoral en favorisant la dissémination des cellules tumorales, l'implantation des métastases et l'angiogenèse [283]. *In vivo*, l'injection de la lignée B16F10 qui exprime constitutivement la galectine-3 induit le développement de métastases pulmonaires. L'inhibition de l'expression de la galectine-3 dans les cellules B16F10 par transfection avec un shRNA permettait de diminuer de plus de 50% le nombre de métastases pulmonaires. La Galectine-3 induit l'expression de MMP-1 favorisant la motilité des cellules tumorales [284]. Dans le même modèle B16F10, les tumeurs primaires implantées en sous-cutané dans des souris B6 WT ou Galectine-3 KO se développent de la même manière. Par contre, après une injection intraveineuse des cellules tumorales, beaucoup moins de métastases pulmonaires étaient observées dans les souris KO. Comme la Galectine-3 est exprimée par les cellules épithéliales du poumon et les cellules endothéliales, elle pourrait favoriser l'ancrage des cellules tumorales circulantes dans les poumons [285].

Chez l'homme, une augmentation de la concentration en Galectine-3 est observée dans le sérum des patients cancéreux et plus particulièrement chez les patients qui ont développé des métastases. Des titres élevés en Galectine-3 seraient associés à un nombre plus élevé de métastases et à un mauvais pronostic dans différents types de cancer comme

les cancers colorectaux, de la thyroïde et des ovaires [286, 287].

Enfin la Galectine-3 semble avoir également un rôle pro-inflammatoire. *In vivo*, les souris Galectine-3 KO développent une encéphalite auto-immune moins sévère que les souris WT, qui se traduit par une plus faible infiltration de macrophages et de monocytes dans le système nerveux central. Cette diminution de l'infiltration n'est pas liée à une plus faible migration vers la moëlle épinière mais à une apoptose accrue. Les lymphocytes provenant des ganglions de souris Galectine-3 KO, restimulés *in vitro* par le peptide encéphalitogène, produisent moins de cytokines inflammatoires comme l'IL-17 mais davantage de cytokines Th2 comme l'IL-5, l'IL-13 ou encore l'IL-10, ce qui s'accompagne d'une fréquence plus élevée de Tregs FoxP3⁺ [288].

La concentration en Galectine-3 est augmentée dans le sérum et le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Elle contribue à l'activation des fibroblastes de la synovie. Elle peut être considérée comme un marqueur d'activité de la maladie [289].

Finalement, la Galectine-3 aurait aussi un rôle pro-fibrotique dans différents modèles murins comme la fibrose hépatique ou rénale, en activant les fibroblastes [290].

Galectine-9

Une analyse par Northern blot montre que la Galectine-9 est très fortement exprimée chez l'adulte au niveau du thymus, du foie et de l'intestin et dans une moindre mesure dans le poumon, la rate, les lymphocytes périphériques, le cœur et les muscles squelettiques [291, 292]. Une expression de la Galectine-9 par les lymphocytes Tregs provenant de la rate de souris naïves a été également décrite [293]. Son expression peut être induite par l'IFN γ dans les fibroblastes et les cellules endothéliales, par l'IL-1 β dans les astrocytes et par l'IL-5 dans les neutrophiles [292].

Au niveau du thymus, la Galectine-9 jouerait un rôle dans les interactions entre les thymocytes et les cellules épithéliales ainsi que dans la délétion clonale. L'incubation *in vitro* de thymocytes de souris avec de la Galectine-9 induit l'apoptose de 30% des cellules [291]. La Galectine-9 induit également l'apoptose de lignées tumorales humaines comme la lignée T MOLT-4, la lignée B BALL-1, la lignée monocyttaire THP1 ou encore la lignée myélocytaire HL-60. Cette entrée en apoptose varie en fonction de la concentration en Galectine-9 et est médiée par une activation de la caspase-1 [294].

Au niveau des T humains périphériques, la Galectine-9 induit l'apoptose principalement des T activés, les CD4⁺ y étant plus susceptibles que les CD8 [294]. Chez la souris, l'incubation de lymphocytes T polarisés en Th1 induit leur entrée rapide en apoptose alors que les Th2 y seraient insensibles [295]. Elle induit également l'apoptose des TH17 polarisée *in vitro*. Par contre, elle favorise la différenciation et la prolifération des Treg FoxP3⁺ induite par le TGFβ [296]. Les T CD8 alloréactifs sont également sensibles à l'apoptose induite par la Galectine-9, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ainsi, l'administration de Galectine-9 à des souris prolonge significativement la survie de greffes de peau allogéniques [293]. L'apoptose des Th1, Th17 et des T CD8 cytotoxiques induite par la Galectine-9 passerait par son interaction avec le récepteur Tim-3 exprimé par ces cellules [292, 293]. Mais Tim-3 ne semble pas être le seul ligand de la Galectine-9 puisqu'elle peut réguler l'activité des Th1 indépendamment de Tim-3 [297].

Au niveau des tumeurs l'expression de la Galectine-9 est généralement diminuée par rapport à celle trouvée dans les tissus normaux équivalents. Son niveau d'expression a d'ailleurs un caractère prédictif : l'absence d'expression de la Galectine-9 serait associée au développement de métastases alors que la survie serait meilleure chez des patients dont la tumeur exprime fortement la Galectine-9 [298]. En effet, la Galectine-9 serait impliquée dans l'adhésion des cellules tumorales entre elles, à différents composants de la matrice extracellulaire, comme le collagène, la fibronectine ou la lamine, ou encore aux endothéliums. Elle aurait ainsi un rôle anti-métastatique. L'administration *in vivo* de Galectine-9 à des souris injectées avec le mélanome B16F10 ou le carcinome du colon CT26 réduit le nombre de métastases pulmonaires [299].

Comme d'autres Galectines, la Galectine-9 a également un rôle anti-inflammatoire. Ainsi elle induit l'apoptose des cellules synoviales « fibroblast-like » prélevées chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, diminuant la production de cytokines inflammatoires [300]. *In vivo*, l'administration de Galectine-9 diminue les symptômes de l'encéphalite auto-immune chez la souris en induisant une déplétion spécifique des Th1 produisant de l'IFN γ [295]. Dans l'arthrite à collagène (CIA) son injection diminue l'inflammation des articulations, la destruction des cartilages et l'érosion osseuse. On observe une diminution des Th1 et des Th17 infiltrant les articulations ainsi qu'une diminution de la production de cytokines et chémokines inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, MCP-1 et MIP-2. Les souris B6 Galectine-9 KO deviennent susceptibles à la CIA, comme les DBA/1 alors que les B6 WT y sont résistantes. Cette différence entre B6 Galectine-9 KO et WT serait liée à l'absence d'expansion des Tregs après immunisation au collagène chez les souris déficientes en Galectine -9 [296].

Apoptose des lymphocytes T

Au cours d'une réponse immune, une partie des lymphocytes T qui ont proliféré de manière clonale doivent être éliminés afin de maintenir l'homéostasie du système immunitaire. L'autre partie des lymphocytes T se transformera en lymphocytes T mémoires [301]. L'élimination des lymphocytes T en surnombre se fait par apoptose et est décrite sous le nom d'AICD (Activation Induced Cell Death) [302]. L'apoptose des cellules T est finement contrôlée. Une apoptose insuffisante peut conduire au développement de maladies autoimmunes telles que le lupus [303]. Au contraire, une apoptose excessive peut mener à une lymphopénie telle que celle observée chez certains patients infectés par le virus de la rougeole, pouvant provoquer leur décès [304].

L'apoptose cellulaire a été décrite pour la première fois en 1972 comme étant une mort cellulaire programmée qui suivait, contrairement à la nécrose, une séquence d'événements bien précise. La condensation du noyau, la fragmentation de la chromatine ainsi qu'une diminution du volume cellulaire sont observées. Ensuite, on observe une fragmentation du noyau lui-même et une évagination de la membrane plasmique menant à la formation des corps apoptotiques [305] où des phosphatidylsérines (PS) sont externalisées. L'exposition des PS à la surface des corps apoptotiques favorise leur phagocytose par les macrophages [306].

L'apoptose des lymphocytes T est dépendante des Caspases (Cystein Aspartate Cleaving ProteASE). Deux voies mènent à l'activation des caspases : la voie extrinsèque qui fait intervenir un récepteur de mort cellulaire et la voie intrinsèque qui induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale [301].

Voies de signalisation dépendantes des caspases

Les caspases

Les caspases sont des endoprotéases cytoplasmiques capables de cliver des protéines au niveau d'un résidu aspartique (Asp ; A) grâce à un site catalytique comprenant un résidu Cystéine (Cys ; C) dans un motif QACxG [307]. Les caspases se trouvent dans le cytoplasme sous forme de précurseur inactif appelé zymogène. La protéolyse des zymogènes libère les caspases sous forme active. Elles sont classées en trois catégories : les caspases initiatrices, les caspases effectrices ainsi que les caspases impliquées dans l'activation de cytokines. Les différentes caspases et leurs fonctions sont reprises dans le Tableau 3. A l'exception des caspases 12 et 13, toutes les autres caspases sont exprimées chez l'homme. La fonction de la caspase 14 n'est pas encore clairement comprise [308]. Seules les caspases initiatrices et les caspases effectrices jouent un rôle dans l'apoptose cellulaire.

Les pro-caspases initiatrices peuvent s'auto-activer ou s'activer l'une l'autre lorsqu'elles sont rapprochées [309, 310]. Ce rapprochement spatial est possible grâce aux interactions homophiliques entre les domaines DED (Death Effector Domain) des pro-caspases 8 et 10 et le domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) des pro-caspases 2 et 9. Quand elles sont activées, les caspases initiatrices peuvent alors activer les pro-caspases effectrices 3, 6 et 7 par clivage protéolytique [309, 310]. Les différents domaines des pro-caspases sont repris dans le Tableau 3.

Une fois activées, les caspases effectrices cliveront des protéines impliquées dans l'intégrité des cellules comme l'actine [311]. La caspase-6 clive la lamine qui est la principale protéine de structure de l'enveloppe nucléaire provoquant une déstructuration du noyau [312]. La caspase-3 et la caspase-7 clivent les enzymes de la famille PARP (Poly ADP-ribose polymerase) [313]. Les PARPs recrutent des protéines telles que de l'ADN polymérase ϵ au niveau d'une zone d'ADN endommagé permettant la substitution et le

remplacement de la base abîmée [314]. Le clivage de PARP favorisera le désassemblage du génome [315]. La caspase-3 clive également ICAD (Inhibitor Caspase-Activated Dnase) permettant à la nucléase CAD (Caspase-Activated DNase) de fragmenter l'ADN [316]. Les caspases détruisent aussi des inhibiteurs d'endonucléases. Ces différents clivages provoquent la fragmentation du noyau et des cellules induisant la formation de corps apoptotiques et la mort des cellules. Enfin, l'externalisation de la phosphatidyl sérine (PS) à la membrane cellulaire qui favorise la phagocytose par les macrophages est induite par une caspase, via un mécanisme encore inconnu [317].

Tableau 3 : Les différentes caspases des mammifères, leur fonction et leur structure.

Les principaux synonymes sont indiqués entre parenthèses. DED = death Effector Domain
CARD = CAspase Recruitment Domain. D'après Chang [318].

<i>Nom de la caspase</i>	<i>Fonction</i>	<i>Classification</i>	
Caspase 1 (ICE)	Activation cytokine		N  C
Caspase 2 (ICH-1/mNedd2)	Apoptose	Initiatrice	N  C
Caspase 3 (CPP32/Yama)	Apoptose	Effectrice	N  C
Caspase 4 (TX/ICH-2)	Activation cytokine		N  C
Caspase 5 (TY)	Activation cytokine		N  C
Caspase 6 (Mch2)	Apoptose	Effectrice	N  C
Caspase 7 (Mch3/ICE-LAP3)	Apoptose	Effectrice	N  C
Caspase 8 (FLICE/Mch5)	Apoptose	Initiatrice	N  C
Caspase 9 (Mch6/ICE-LAP6)	Apoptose	Initiatrice	N  C
Caspase 10 (Mch4)	Apoptose	Initiatrice	N  C
Caspase 11 (ICH3)	Activation cytokine		N  C
Caspase 12	Activation cytokine		N  C
Caspase 13 (ERICE)	Activation cytokine		N  C
Caspase 14 (MICE)			N  C
Légende			 DED  CARD  Longue unité catalytique  Petite unité catalytique

Voie de signalisation extrinsèque

Dans la voie de signalisation extrinsèque c'est l'activation d'un récepteur dit de « mort cellulaire » qui permet l'activation des caspases et l'entrée en apoptose des cellules. Six récepteurs de mort cellulaire (Death Receptor ou DR) sont décrits [319] chez l'homme. Les différents récepteurs et leurs ligands sont repris dans le Tableau 4.

Tableau 4 : **Les récepteurs de mort cellulaire et leurs ligands.**

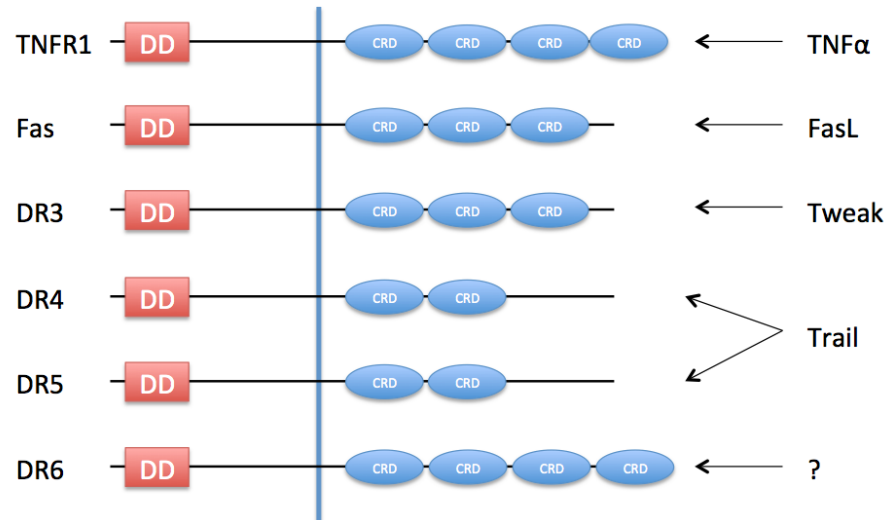
Les synonymes sont indiqués entre parenthèses, en gras sont indiqués les noms utilisés dans ce travail. D'après Mahmood [319]

<i>Récepteur de mort</i>	<i>Ligand associé</i>
DR1 (TNFR1 , CD120a, p55)	TNFα
DR2 (Fas , CD95, Apo1)	CD95L (FasL)
DR3 (Apo3, TRAMP, LARD)	Apo3L (Tweak)
DR4 (Apo2, TRAIL-R1)	Apo2L (Trail)
DR5 (TRAIL-R2, TRICK2, KILLER)	Apo2L (Trail)
DR6	?

Ces récepteurs de mort cellulaire contiennent tous des domaines extracellulaires riches en cystéine (domaine CRDs) qui sont la signature des TNFRs [320]. Les DRs contiennent également un domaine DD (Death Domain) intracellulaire qui joue un rôle crucial dans la transmission du signal de mort suite à la fixation du ligand [321, 322]. La structure des différents récepteurs est reprise dans la Figure 6.

Figure 6 : **Représentation schématique de la structure des différents récepteurs DR.**

DD = Death Domain, CRD = Cystein Rich Domain. D'après Aggarwal [323]

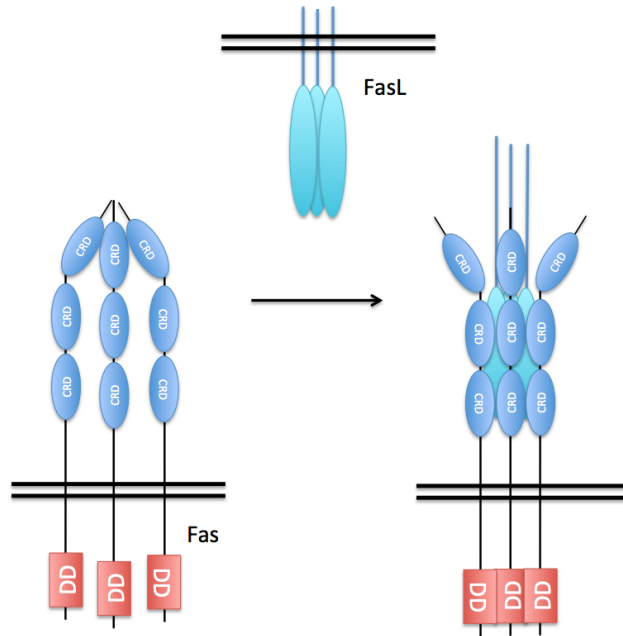


Le récepteur de mort cellulaire le plus décrit est le récepteur Fas. Son expression ainsi que son rôle physiologique seront précisément décrits dans le chapitre suivant mais nous l'utiliserons comme modèle pour décrire la voie de signalisation intrinsèque qui conduit à l'entrée des cellules en apoptose.

Le récepteur Fas se trouve à la surface cellulaire sous forme d'un trimère [324, 325, 326]. La fixation de FasL induit une modification structurale des domaines intracellulaires de Fas permettant le rapprochement des trois domaines DD [327] (Figure 7).

Figure 7 : Représentation schématique du changement de conformation du récepteur Fas suite à la fixation de son ligand, FasL.

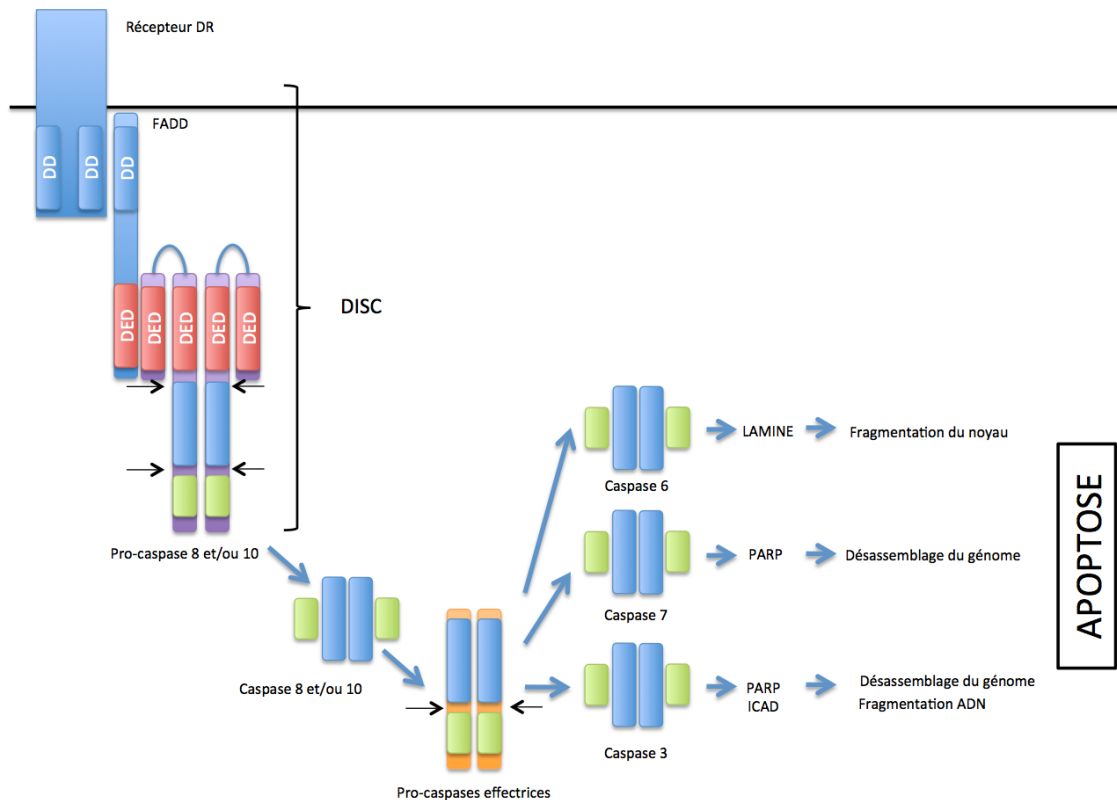
D'après Siegel [327].



Le rapprochement des trois domaines DD permet le recrutement de la molécule adaptatrice : FADD (FAS Associated Death Domain) [328]. Cette protéine adaptatrice contient elle aussi un domaine DD ainsi qu'un domaine DED [329]. L'association entre les domaines DD des récepteurs Fas et de FADD se fait par interaction homophile [330]. Une fois Fas et FADD associés, le domaine DED de FADD interagit avec le domaine DED d'une pro-caspases 8 et /ou 10 permettant le recrutement d'une deuxième pro-caspases 8 et/ou 10 [301, 331]. Le complexe protéique associé à la membrane, composé des récepteurs DRs, des FADDs et des pro-caspases 8 et 10 forme le DISC (Death-inducing signalling complex). Cet assemblage permet le rapprochement des pro-caspases 8 et 10 et leur auto-clivage. Les caspases 8 et 10 vont à leur tour activer les caspases effectrices (Figure 8)

Figure 8 : **Représentation schématique de la voie de signalisation extrinsèque.**

Les flèches représentent les zones de clivage. Inspiré de Krammer et Arnold [301]



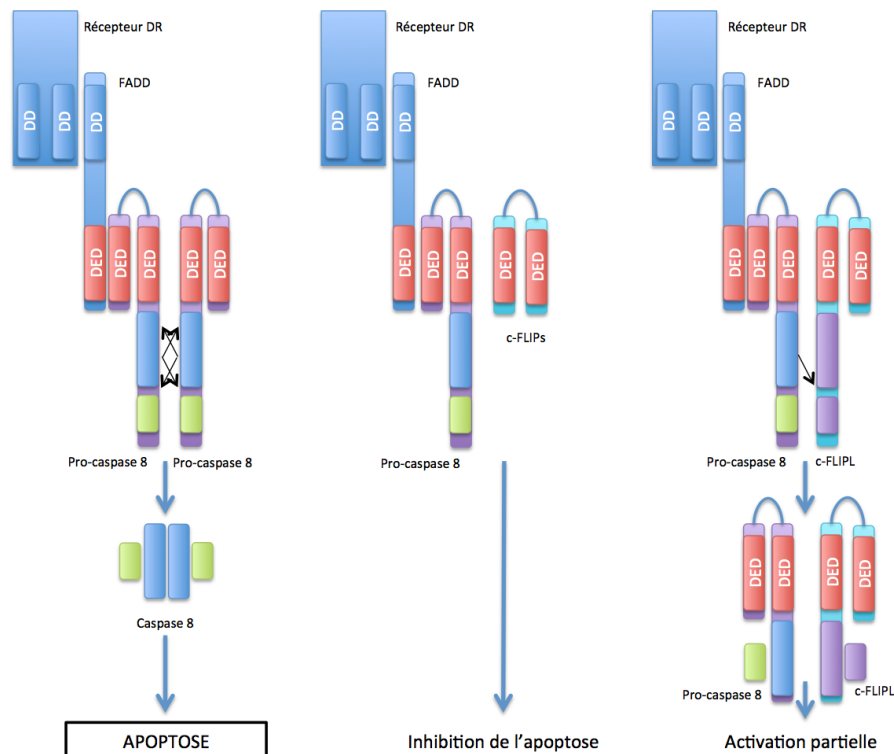
L'entrée en apoptose des cellules suite à la fixation d'un ligand sur son récepteur de mort dépend du nombre de récepteurs activés qui peuvent se regrouper en un endroit [332]. Le regroupement d'un grand nombre de complexes DISC permet leur internalisation, la production importante de caspases-8 activées et l'entrée en apoptose des cellules [333]. Par contre, l'absence d'internalisation due à un nombre insuffisant de complexes DISC formés, un faible recrutement de FADD et une faible activation de la caspase-8 ne permettra pas l'entrée en apoptose des cellules sans l'intervention de la voie d'apoptose intrinsèque [334].

Enfin l'activation de la caspase-8 ou de la caspase-10 peut être régulée au niveau du complexe DISC par cFLIP (cellular FLICE/Caspase-8 like Inhibitor Protein). cFLIP, l'homologue cellulaire d'une protéine virale précédemment décrite par l'équipe de Tschopp

[335], contient deux domaines DED qui lui permettent d'interagir avec la molécule adaptatrice FADD [328] et avec la pro-caspase 8. Deux isoformes de cFLIP sont décrites : une isoforme courte cFLIP_s et une isoforme longue cFLIP_L. L'isoforme longue possède un domaine homologue aux caspase 8 et 10, sans activité catalytique. La formation d'un hétérocomplexe entre pro-caspase 8 ou 10 et cFLIP_s ne permet pas l'activation de la caspase 8 ou 10 tandis que l'interaction entre cFLIP_L et pro-caspase 8 ou 10 ne permet qu'une activation partielle de celle-ci n'entraînant pas la mort cellulaire [336] (Figure 9). La délétion de cFLIP dans des fibroblastes les sensibilise fortement à l'apoptose induite par les récepteurs DR [337]. Enfin, l'expression transitoire de cFLIP par les lymphocytes T humains, suite à leur activation, induit une résistance à l'apoptose qui diminue au cours du temps [338].

Figure 9 : **Représentation schématique des interactions entre la pro-caspase 8 et la protéine inhibitrice cFLIP.**

Les flèches représentent les actions de clivage. Inspiré de Budd [339] et de Krammer [301] structure pro



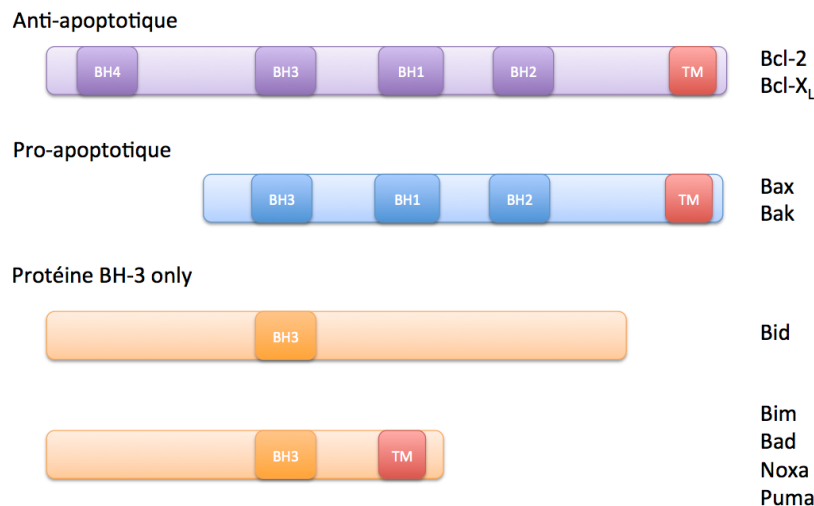
Voie de signalisation intrinsèque

De nombreux signaux tels que le manque de facteurs de croissance, l'absence de cytokines ou des dommages au niveau de l'ADN induisent l'apoptose cellulaire par la voie de signalisation intrinsèque, également appelée voie d'apoptose mitochondriale [340]. Cette voie d'apoptose est régulée par la balance entre différentes protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma 2) qui influencent la perméabilité de la membrane mitochondriale.

Les protéines Bcl-2 possèdent toutes un à quatre domaines homologues dits domaines BH (Binding Homology) qui permettent de les classer selon leur fonction qui peut être pro-apoptotique ou anti-apoptotique [341-343]. Les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou Bcl-X_L (Bcl2-like 1 isoform 1) possèdent les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 et peuvent interagir avec les protéines pro-apoptotiques Bax (Bcl-2 associated X protein) et Bak (Bcl-2 antagonist/killer) qui ne contiennent pas le domaine BH4 (Figure 10)

Figure 10 : **Structure et classification des membres de la famille Bcl-2.**

TM = domaine transmembranaire, BH = Binding Homology. Inspiré de Cory et Adams [344]



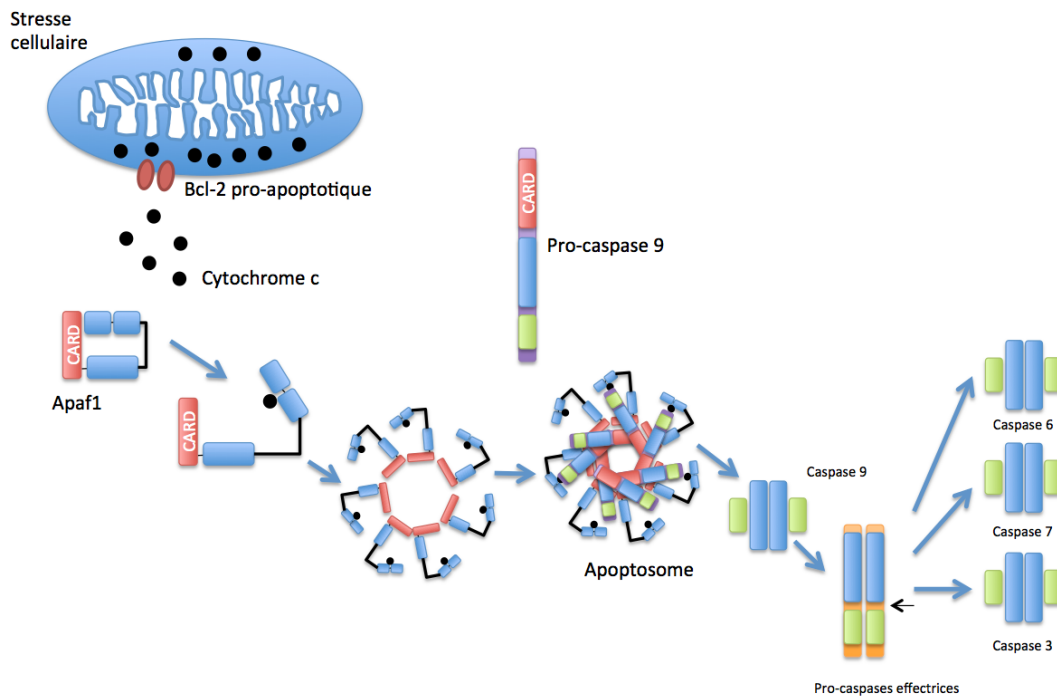
Les protéines pro-apoptotiques qui ne contiennent qu'un domaine BH3, dites protéines BH3-only, régulent l'entrée en apoptose suite à un stress cellulaire en interagissant avec les protéines pro- ou anti-apoptotiques [340]. Les protéines de la famille

Bcl-2 peuvent posséder, ou non, un domaine transmembranaire qui permet leur ancrage dans les membranes externes des mitochondries, du noyau et du réticulum endoplasmique [345].

Les protéines Bax et Bak favorisent l'apoptose cellulaire en s'intégrant sous forme d'homodimères dans la membrane externe des mitochondries pour former des MOMPs (mitochondrial outer membrane permeabilization). Il est couramment admis que Bax et Bak forment des canaux [346] ou des pores [347] dans la membrane mitochondriale permettant la diffusion dans le cytoplasme cellulaire du cytochrome c ainsi que deux activateurs de caspases : DIABLO/SMAC (direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pH /Second mitochondria-derived activator of caspase) et HTRA2/OMI (High-Temperature Requirement protein A2). La libération du cytochrome c est indispensable pour l'entrée en apoptose des cellules suite à un stress comme une irradiation [348]. Le cytochrome c interagit avec la protéine cytoplasmique Apaf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1) induisant une modification de sa structure, ce qui lui permet de former un heptamère. Les protéines Apaf-1 possèdent des domaines CARDs qui vont interagir par réaction homophile avec ceux de la pro-caspase 9. Ce complexe protéique est appelé apoptosome [349]. Les pro-caspases 9 recrutées dans l'apoptosome sont alors clivées et vont à leur tour cliver les pro-caspases effectrices 3, 6, et 7. Les voies d'apoptose extrinsèque et intrinsèque convergent donc au niveau des caspases effectrices (Figure 11).

Figure 11 : **Représentation schématique de la voie d'apoptose intrinsèque.**

Inspiré de de Krammer [301]



La formation des complexes MOMPs à la membrane mitochondriale est fortement contrôlée par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi l'absence de Bcl-X_L induit, chez la souris, la mort d'un nombre important de cellules hématopoïétiques [350], tandis que l'absence de Bcl-2 conduit à une mort massive des lymphocytes et des progéniteurs de mélanocytes [351]. Ces phénotypes sont dus au fait que Bcl-2 et Bcl-X_L limitent la formation des MOMPs en inhibant l'homodimérisation de Bax ou Bak ainsi que leur translocation au niveau de la membrane mitochondriale [352]. Les protéines Bcl-2 et Bcl-X_L sont elles-mêmes régulées au niveau transcriptionnel et/ou post-translationnel. Par exemple, lors de l'activation d'un lymphocyte T naïf, la reconnaissance d'un antigène en présence de CD28 induit une augmentation de l'expression de Bcl-xL [353]. La régulation post-translationnelle peut être due soit à la phosphorylation de Bcl-2 ou Bcl-X_L qui stabilise l'interaction avec Bax ou Bak, soit à des interactions avec les protéines BH3-only libérant Bax ou Bak [354].

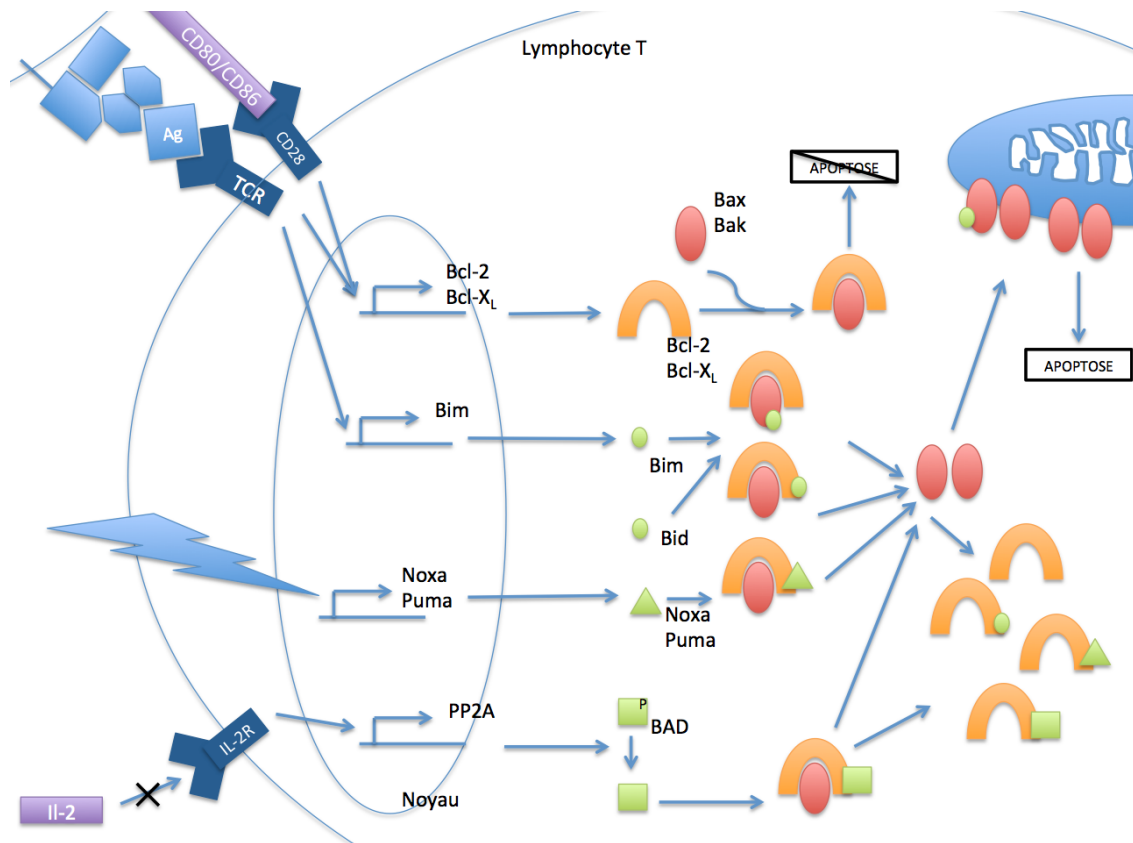
Les protéines BH3-only sont souvent décrites comme des régulateurs et des senseurs de l'apoptose cellulaire par la voie intrinsèque. Chez les mammifères, on distingue 8 protéines BH3-only qui peuvent toutes interagir, grâce à leur domaine BH3, avec au moins une des protéines anti-apoptotiques, ce qui favorise l'apoptose cellulaire [355]. Certaines protéines BH3-only, dont Bid (BH3 Interacting-Domain) et Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death), peuvent également interagir avec les protéines pro-apoptotiques Bax ou Bak favorisant la formation des MOMP's et l'apoptose cellulaire [356, 357]. Toutefois les protéines BH3-only n'induisent pas directement l'apoptose des cellules car, même si elles sont surexprimées, en absence de Bax ou Bak on ne détecte pas d'apoptose [358]. Les protéines BH3-only interviennent donc en amont de Bax et Bak et leur action pro-apoptotique est régulée soit de manière transcriptionnelle, comme c'est le cas de NOXA et PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis), soit de manière post-translationnelle comme c'est le cas de Bad (Bcl-2 Associated Death promoter) ou Bid ou les deux comme c'est le cas de Bim [357, 359-366].

Le traitement par rayon x de cellules murines induit l'expression de NOXA et PUMA qui interagiront avec Bcl-2 et Bcl-X_L favorisant l'homodimérisation de Bax et Bak [359, 360] et donc l'apoptose. PUMA peut également être induit par la privation en facteur de croissance ou en présence de glucocorticoïdes [361]. Bad, une autre protéine BH-3 only, est un senseur de la privation en certaines cytokines comme l'IL-2. En absence d'IL-2, on observe l'expression dans les lymphocytes T de la protéine phosphatase 2A (PP2A). PP2A peut alors déphosphoryler Bad [362] qui pourra dès lors interagir avec Bcl-2 et Bcl-X_L [367] libérant Bax et Bak [368] (Figure 12).

Il a également été montré, dans les hépatocytes, que Bid pouvait être activé par la caspase-8 suite à la fixation d'un faible nombre de ligands sur les récepteurs de mort cellulaire. Il pouvait dès lors interagir avec Bcl-2, Bcl-X_L ou avec Bak et Bax [357, 363] induisant l'apoptose des hépatocytes. Toutefois, les souris KO pour Bid ne montrent pas de lymphoprolifération excluant un rôle majeur de Bid dans l'induction de l'apoptose des lymphocytes [364].

Bim a été décrit comme un régulateur d'apoptose dans de nombreux types cellulaires dont les lymphocytes T. L'expression de Bim est augmentée suite à l'activation via le TCR mais n'induit pas l'entrée en apoptose des cellules. En effet, dans la lignée de lymphocytes T BK289, l'activation des cellules induit une expression de Bim mais aussi de Bcl-X_L qui interagissent entre elles provoquant un arrêt de l'apoptose cellulaire. Bim peut également interagir avec d'autres molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 [365]. Dans certaines conditions comme une privation en IL-7, l'expression des membres de la famille Bcl-2 diminue ce qui permet la libération de Bim et son activation [369].

Figure 12 : **Représentation des différentes interactions des protéines de la famille Bcl-2**



Enfin la voie intrinsèque est également régulée au niveau de l'activité de l'apoptosome grâce à des inhibiteurs d'apoptose (IAP). Initialement décrites dans les baculovirus [370], les IAPs, dont XIAP (X-chromosome linked IAP) se lient à la caspase 9 et inhibent son activité [371, 372]. Mais XIAP peut également se fixer à la caspase 3 et à la caspase 7 [373]. Le fait que XIAP puisse interagir avec différentes caspases permet de réguler de manière simultanée la voie d'apoptose intrinsèque et extrinsèque [374]. La libération de SMAC/DIABLO lors de la formation du complexe MOMP, permet sa liaison avec les IAPs dont XIAP [375, 376] libérant les caspases 9, 3 et 7 causant l'entrée en apoptose des cellules. Comme SMAC/DIABLO, HTRA2/OMI peut interagir [377] ou cliver [378] les IAPs permettant l'activation des caspases 9, 3 et 7.

Collaboration entre la voie intrinsèque et la voie extrinsèque

En 2008, une étude menée par Hughes [379] a montré qu'à la suite d'une infection virale aigüe, l'apoptose des lymphocytes T CD8 était induite par l'activation de la voie intrinsèque. Par contre, lors d'une infection virale chronique, il observait une activation des deux voies : l'activation chronique du TCR induisait l'expression de Fas et de FasL sur les lymphocytes T ainsi que l'expression de Bim [379]. La même année, une autre équipe a également montré que tant la voie intrinsèque que la voie extrinsèque étaient nécessaires à la contraction de la réponse immunitaire suite à une infection virale [380]. L'activation de Bim lors d'une infection chronique peut s'expliquer par l'absence de production d'IL-2 par les lymphocytes T dans ces conditions [81]. Enfin en 2011, une collaboration entre Bid et Bim a été décrite durant une infection virale chronique : si Bid n'est pas essentiel à l'induction d'apoptose par la voie Fas, il permet cependant d'amplifier la synergie entre les deux voies d'apoptoses [381].

Autre voies d'Apoptose

On observe dans certains cas l'entrée en apoptose des cellules sans que les voies intrinsèque et extrinsèque soient activées.

Le Granzyme B (Granule Enzyme) provoque l'entrée en apoptose de nombreux types cellulaires par clivage des caspases. Il fait partie de la famille des Granzymes qui sont des protéases à sérine contenues dans les granules excrétés par les NK ou les lymphocytes T cytotoxiques à la suite de l'engagement du TCR [382]. Il a été montré que le granzyme B induisait l'apoptose par un clivage direct de la pro-caspase 3 et présentait *in vitro* une activité protéolytique sur les pro-caspases 6, 7, 8, 9 et 10 [382].

La cathepsine B est une cysteine protéase contenue dans les lysosomes. En cas de stress cellulaire, comme la présence de ROS [383], le lysosome relâche de la cathepsine B qui viendra cliver la protéine Bid [384] permettant la formation de MOMP et l'activation de la pro-caspase 9. Cependant Bid n'est pas la seule cible de la cathepsine B puisqu'on observe l'entrée en apoptose des cellules du cervelet par la voie des cathepsines dans des souris KO pour BID [385].

CD24 est une « glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoprotein » exprimée transitoirement lors du développement et de la différenciation des cellules appartenant à la lignée lymphoïde ou neurale. Fortement exprimé au niveau des thymocytes doublement négatifs ou doublement positifs, CD24 est impliqué dans la délétion des thymocytes en absence de stimulation de leur TCR. Il a été montré que l'activation de CD24 induit l'externalisation de PS, une diminution de la polarité des mitochondries provoquant la libération de AIF (Apoptosis-Inducing Factor) [386]. La protéine AIF est une flavoprotéine qui exerce son activité pro-apoptotique en induisant la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Son activité pro-apoptotique est indépendante des caspases. En effet, l'ajout d'un puissant inhibiteur de caspase, le Z-VADfmk, n'inhibe pas l'activité de la protéine d'AIF [387].

Mécanismes d'induction d'apoptose des lymphocytes

Les récepteurs de mort cellulaire

Fas et FasL

Le récepteur Fas est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des TNFR récepteurs. Fas est caractérisé par la présence de trois régions extracellulaires riches en cystéine (région CRD) [388] et d'un domaine DD dans sa partie intracellulaire [389]. Les domaines CRDs sont nécessaires à l'interaction entre Fas et son ligand. En effet, lorsqu'un des deux domaines CRDs les plus proches de la membrane est muté, la liaison entre Fas et son ligand est abolie ainsi que le signal d'apoptose [390]. Par contre, lorsque le premier CRD est muté, l'apoptose persiste mais est diminuée. Ce premier CRD permet la trimérisation des récepteurs Fas en absence de ligand, grâce à une interaction homophile [324-326]. L'absence de trimérisation du récepteur Fas limite l'entrée en apoptose des lymphocytes T induisant chez l'homme le développement d'un syndrome lymphoprolifératif auto-immun de type Ia [326]. Le domaine DD est constitué de 6 hélices α qui changent de conformation en présence du ligand permettant l'oligomérisation des complexes Fas/FasL ainsi que le recrutement de FADD [391].

De l'ARNm codant pour Fas est détecté dans de nombreux tissus dont le thymus, le foie, le cœur, les poumons, les reins et les ovaires [392]. Fas n'est pas exprimé sur les lymphocytes T naïfs mais son expression est induite tant chez l'homme [393] que chez la souris [394] suite à l'engagement du TCR. Fas est également exprimé sur les macrophages, les éosinophiles et les neutrophiles [395].

FasL une protéine transmembranaire de type II qui fait partie de la famille du TNF. Elle possède dans sa région extracellulaire un domaine homologue au TNF (THD) [396]. Ce domaine THD permet l'interaction entre FasL et les domaines CRDs de Fas. En 2003, il a été montré que FasL induisait l'apoptose uniquement si les ligands formaient un complexe

trimérique associé à une membrane [397]. L'oligomérisation est possible grâce à la région d'auto-assemblage (domaine SA) située près de la membrane cytoplasmique [396]. FasL possède également un domaine MP-s (Metalloprotease Substrate Site) qui permet le clivage de sa partie extracellulaire par une métalloprotéinase, libérant du FasL soluble (sFasL). Ainsi le traitement des lymphocytes T avec de l'acide hydroxamique, un inhibiteur de métalloprotéinase, augmente le nombre de molécules FasL à la surface des cellules et diminue celui de FasL soluble dans le surnageant de culture [398]. Contrairement aux autres membres de la famille TNF, FasL possède dans sa région intracellulaire un domaine riche en proline (PRD) permettant son interaction avec des protéines qui régulent sa mobilisation et sa localisation à l'intérieur des cellules [399] (Figure 13).

Figure 13 : **Représentation schématique de la structure de FasL**

THD = domaine homologue au TNF ; SA = région d'auto-assemblage ; MP = Substrat pour une Métalloprotéase ; TM = Domaine Transmembranaire ; PRD = Domaine riche en proline [399]



L'expression de FasL est beaucoup plus restreinte que celle de son récepteur. Exprimé principalement sur les lymphocytes T, les cellules NK [400] et les macrophages [401] activés, FasL peut être également détecté sur les cellules de Sertoli dans les testicules [402] ou sur les cellules épithéliales présentes dans la chambre inférieure de l'oeil [403].

Les neutrophiles humains expriment FasL sans qu'on le détecte en surface. *In vitro*, il a été montré que ces cellules relarguent FasL sous forme soluble [395] [404].

Au niveau des lymphocytes T, l'expression de FasL est induite par la reconnaissance de l'antigène [405]. L'engagement du TCR active les tyrosines kinases Zap-70 (Zeta Associated Protein – 70 kDa) et lck (tyrosine protéine kinase) permettant la transcription

du facteur Egr-3 (Early Growth Response Gene-3) menant à la transcription de FasL [406]. La délétion de ZAP-70 dans des cellules Jurkat empêche l'augmentation de l'expression de FasL et diminue leur sensibilité à l'AICD [407]. Inversement, la transfection de Zap-70 dans une lignée de lymphocytes T déficients pour cette kinase permet de restaurer l'expression de FasL et leur sensibilité à l'apoptose [408]. L'IFN γ induit également l'expression de FasL sur les lymphocytes T. En effet, la fixation de l'IFN γ sur son récepteur amplifie l'expression du facteur de transcription IRF-1 (Interferon Regulatory Factor-1) qui peut se fixer sur le promoteur de FasL et induire sa transcription. Le blocage de l'expression de IRF-1 par mutagénèse ou délétion diminue celle de FasL sur les lymphocytes T [409].

La fixation de mFasL (FasL membranaire) sur son récepteur conduit à l'oligomérisation des complexes Fas/FasL qui seront internalisés dans une vésicule endosomique permettant la formation du DISC, première étape de la voie d'apoptose extrinsèque [332] [410]. L'apoptose est inhibée par l'hydrolyse du phospholipide PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) responsable de l'internalisation du complexe DISC [333].

L'apoptose des lymphocytes T par la voie Fas/FasL peut se produire par un mécanisme de suicide ou de mort fratricide. Les lymphocytes T activés expriment Fas et deviennent sensibles à l'apoptose à cause d'une diminution de l'expression de cFLIP [338]. Cette activation induit aussi l'expression de mFasL sur ces mêmes lymphocytes. Fas et mFasL peuvent alors interagir soit à la surface d'une même cellule soit avec une cellule voisine [411]. Dans ce-cas ci, la délétion des lymphocytes T n'est pas spécifique de l'antigène mais dépend de leur état d'activation [412]. Il a de fait été montré que les lymphocytes T naïfs ne sont pas sensibles au suicide cellulaire [413].

En théorie, l'apoptose des lymphocytes T pourrait également être induite par un mécanisme paracrine via sFasL. Toutefois, seule la forme membranaire semble jouer un rôle. En effet, les souris KO pour sFasL ne montrent pas de problème d'auto-immunité tandis que les souris KO pour la forme membranaire meurent d'un syndrome proche du lupus [414]. sFasL semble avoir plutôt un rôle pro-inflammatoire en favorisant le

recrutement des neutrophiles et leur production d'IL-1 β [415]. Quelques études montrent cependant un rôle de sFasL dans l'apoptose mais ceci semble lié à la forme de sFasL utilisée. En effet, la forme naturelle de sFasL n'induit pas l'apoptose [416] tandis qu'une forme recombinante de sFasL constituée de l'ensemble du domaine extracellulaire l'induit [417]. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le sFasL recombinant permet l'oligomérisation du ligand, ce que ne permet pas la forme naturelle [418].

L'apoptose par la voie Fas/FasL est critique pour le développement et l'homéostasie du système immunitaire. En effet, une mutation dans Fas, comme chez les souris *lpr* (LymphoPRolifération) [419] ou dans FasL, comme chez les souris *gld* (Generalized Lymphoproliferation Disease) [420] provoque une lymphoprolifération importante et conduit au développement d'un syndrome auto-immun. Chez l'homme, ces mutations provoquent un syndrome sévère de lymphoprolifération (ALPS) [421, 422]. Chez les souris KO pour Fas ou pour FasL, la lymphoprolifération observée est beaucoup plus importante que chez les souris *lpr* ou *gld* [423]. Ceci est dû au fait que les souris *lpr* et *gld* expriment toujours une petite quantité de Fas ou FasL [424, 425]. Dans ces deux souches de souris la délétion thymique semble normale mais pas la délétion périphérique, ce qui serait donc la cause de l'accumulation des lymphocytes [426, 427]. L'introduction d'un transgène codant pour Fas dans les souris *lpr* restaure la délétion des lymphocytes T et bloque le développement du syndrome lymphoprolifératif [428]. Toutes ces expériences confirment que Fas et FasL jouent un rôle crucial dans la mort cellulaire programmée des lymphocytes T en périphérie.

Enfin la voie Fas/FasL joue également un rôle important dans l'homéostasie des lymphocytes B [429]. Il a été montré *in vivo*, que la délétion de Fas au niveau des lymphocytes B provoque une lymphoprolifération des lymphocytes B mémoires. Cette lymphoprolifération est due à l'absence d'un contrôle par les lymphocytes Th1 activés qui expriment FasL et qui induisent l'entrée en apoptose des B avec lequel ils interagissent [429]. Une autre étude réalisée chez des souris déficientes pour FasL dans les lymphocytes T uniquement montre une augmentation du nombre de lymphocytes B et de cellules dendritiques. En plus d'influencer l'homéostasie de la réponse T, l'expression de FasL par

les lymphocytes T permet de contrôler la population de lymphocytes B et des cellules dendritiques [430].

Le rôle de la voie Fas/FasL dans l'apoptose des lymphocytes T au niveau des tumeurs, permettant leur échappement, est encore le sujet de nombreuses études et controverses.

Chez l'homme, différents types de tumeurs exprimeraient FasL. C'est le cas de certains mélanomes [431], certains cancers du foie [432] ou du colon [433]. Ainsi, des marquages immunohistochimiques *ex vivo* montrent une expression de FasL par 60% des tumeurs colorectales [434]. La lignée de cancer du colon SW620, exprimant FasL, induit *in vitro* l'apoptose des lymphocytes T activés [435]. Il a été montré également que des cellules ascitiques de cancer de l'ovaire sécrètent du sFasL ou expriment FasL *in situ* ainsi qu'après plusieurs passages *in vitro*. Ces carcinomes ovariens FasL⁺ sont capables d'induire *in vitro* l'apoptose de lymphocytes T exprimant Fas [436].

Cependant, il a également été montré *in vivo* que l'injection de cellules tumorales transfectées avec FasL permettait le rejet de ces même cellules grâce à un recrutement massif de neutrophiles [437]. La présence des neutrophiles provoquerait la production de NO et de superoxydes induisant ainsi l'entrée en apoptose des cellules tumorales [438]. L'injection d'un vecteur viral codant pour FasL dans l'environnement d'un carcinome du colon, tumeur CT26 Fas⁻, provoque également le rejet tumoral. Il semblerait que le rejet des tumeurs serait dû, ici aussi, à un recrutement massif de cellules inflammatoires [439]. Enfin il a été montré dans le cas du mélanome que ce n'étaient pas les cellules tumorales qui exprimaient FasL, mais plutôt l'infiltrat leucocytaire [440]. En outre, il a été montré que dans de nombreux types de cancer ce sont les cellules endothéliales qui expriment FasL et non les cellules tumorales [441].

Découvert en 1975, le TNF α a été initialement décrit comme un facteur soluble produit par les macrophages, capable de provoquer la nécrose hémorragique de tumeurs solides [442]. Le TNF α est transcrit sous forme d'un précurseur, le pro-TNF α , exporté à la membrane formant le TNF α membranaire, mTNF α , où il peut être clivé par la métalloprotéinase TACE (TNF Alpha Converting Enzyme) libérant le TNF α soluble, sTNF α . Des lymphocytes T déficients pour TACE sont incapables de produire du sTNF α et montrent une accumulation de mTNF α à leur surface [443]. Les deux formes de TNF α sont actives sous la forme d'homotrimères capables d'interagir avec un récepteur TNF [444]. Principalement produit par les cellules hématopoïétiques telles que les macrophages, les monocytes, les lymphocytes T ou B ainsi que les NK activés, il peut également être produit par les kératinocytes, les astrocytes, les cellules microgliales et les cellules endothéliales [445, 446]. Sa production est induite par le LPS lors d'une infection bactérienne ou par différentes cytokines comme l'IL-1, l'IL-2, le TNF α lui-même, le GM-CSF, le M-CSF [447].

Le TNF α est une cytokine pléiotropique qui induit la production de cytokines inflammatoires par plusieurs types cellulaires dont les cellules immunitaires, mais également la production d'IL-8 par les cellules épithéliales gastriques [448], ou la production d'IL-33 par les kératinocytes de l'épiderme [449]. Il joue un rôle dans la survie et la prolifération cellulaire, comme dans le cas des cellules de la crête neurale [450], mais aussi, paradoxalement, dans l'apoptose des cellules telles que la lignée de leucémie HL-60 [451-453]. Avec l'IL-1, il constitue un des premiers médiateurs de la réaction inflammatoire. Son rôle principal est de protéger l'organisme contre les infections bactériennes, virales et parasitaires [454, 455]. Sa production excessive conduit au choc septique léthal [456]. Il est impliqué dans les symptômes inflammatoires associés à différentes maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde [457] ou la maladie de Crohn [458]. Des anticorps anti-TNF α sont d'ailleurs utilisés en clinique humaine pour traiter ces maladies [457, 459, 460].

Chez l'homme comme chez la souris, deux récepteurs spécifiques ont été décrits pour le TNF α : le TNFR1 (p55) et le TNFR2 (p75). Comme pour le ligand, les récepteurs sont fonctionnels sous forme d'homotrimères [444]. Le récepteur TNFR1 est une glycoprotéine transmembranaire de type II caractérisée par la présence de quatre régions CRDs et d'un domaine DD dans sa partie intracellulaire [461]. Le TNFR1 possède aussi dans sa partie intracellulaire un domaine TRID (TNF receptor Internalization domain) essentiel à son internalisation [462]. Le récepteur TNFR2 est également une protéine transmembranaire de type II comprenant 4 régions CRDs, mais à la place d'un domaine DD, il possède un domaine TIM (TRAF-Interacting Motifs) [461].

Le TNFR1 est exprimé de manière constitutive par la majorité des cellules alors que l'expression de TNFR2 est régulée et détectée principalement sur les cellules immunitaires dont les lymphocytes T suite à leur activation [446, 463]. Ces deux récepteurs existent également sous forme soluble. Ils sont produits par le clivage de la région extracellulaire de la forme membranaire par TACE, la même métalloprotéinase que celle qui clive le TNF α [464]. Les récepteurs solubles semblent augmenter la biodisponibilité du TNF α lorsque celui-ci est présent en faible concentration tandis qu'ils limiteraient voire inhiberaient l'effet du TNF α à plus haute concentration [465].

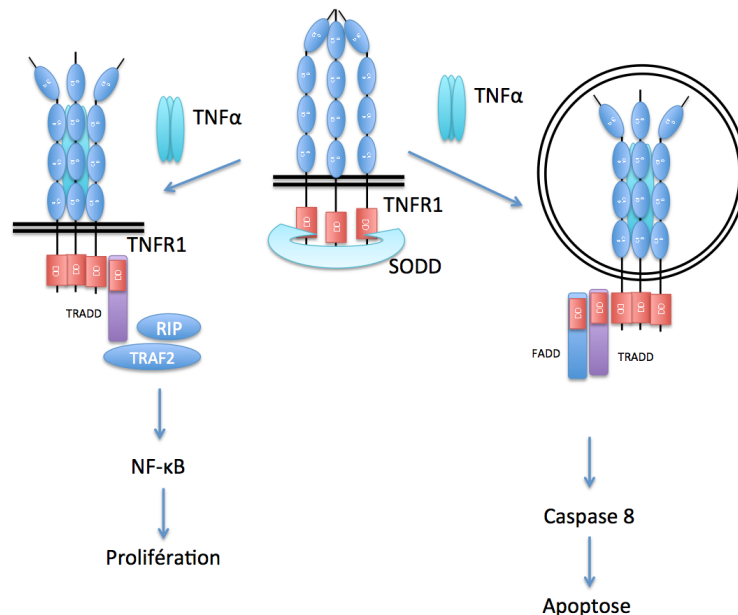
Tant que le récepteur TNFR1 ne rencontre par son ligand, le domaine DD est associé à un répresseur SODD (Silencer Of Death Domain) qui permet de prévenir l'activation constitutive du récepteur sans participer toutefois aux voies de signalisation en aval. En effet, chez des souris KO pour SODD, on ne détecte pas d'anomalie dans la voie de signalisation du TNFR1 [466]. Selon le contexte cellulaire et l'environnement, la fixation du TNF α sur TNFR1 peut induire soit la prolifération, soit l'apoptose, mais le choix du type de réponse n'est pas encore clairement compris [467]. La fixation du TNF α libère SODD dans tous les cas, rendant le domaine DD accessible à l'adaptateur TRADD (TNF Receptor Associated DD). TRADD pourra recruter soit FADD soit TRAF2 (TNF receptor associated factor 2).

Si TRADD recrute FADD, alors le complexe, le récepteur et ses protéines associées, s'internaliseront dans une vésicule ce qui provoquera l'entrée en apoptose de la cellule par activation de la pro-caspase 8. Comme pour le complexe Fas/FasL, bloquer l'internalisation du récepteur en modifiant le domaine TRID par mutation abolit l'entrée en apoptose des cellules [462] (Figure 14).

Si TRADD recrute TRAF2, il pourra interagir avec RIP (Receptor Interacting Protein) et activer la voie NF- κ B [468]. L'activation de NF- κ B permet la transcription de différentes protéines dont des cytokines inflammatoires comme l'IL-6 [469] ou des inhibiteurs d'apoptose tels que cFLIP [470] ou des IAPs [471]. Des cellules déficientes pour RIP ne peuvent pas activer la voie NF- κ B ce qui les rend très sensibles à l'apoptose [472] (Figure 14).

Figure 14 : **Représentation schématique des voies de signalisation du récepteur TNFR1 suite à la fixation du TNF α .**

Inspiré de Wajant [446] et Park [473].



Grâce à son domaine TIM, TNFR2 peut également recruter TRAF2 [474] ce qui diminue sa concentration dans le cytoplasme, favorisant le recrutement de FADD sur le TNFR1 et l'entrée en apoptose des cellules [475]. Toutefois, contrairement à ce qui est observé dans le cas du récepteur TNFR1, l'interaction de TRAF2 avec TNFR2 ne permet pas toujours l'activation de NF- κ B. TRAF2 peut interagir au niveau de deux domaines de TNFR2 ce qui pourra induire ou non l'activation de la voie NF- κ B [476].

Le rôle du TNFR1 et du TNFR2 dans l'apoptose varie selon les systèmes expérimentaux. Zheng et ses collaborateurs [477] montrent que l'apoptose des T dans les souris *lpr*^{-/-} est largement diminuée par rapport aux lymphocytes T WT mais que cette apoptose résiduelle peut être abolie par des anticorps anti-TNF α . Elle est inhibée de manière plus importante dans des lymphocytes T TNFR2 KO qu'en absence de TNFR1. Ils montrent également que le TNF α induirait l'apoptose principalement des T CD8 alors que les T CD4 sont beaucoup plus sensibles à l'interaction Fas/FasL. Une coopération entre TNFR1 et TNFR2 est décrite pour la lignée T humaine Jurkat : la transfection du TNFR2 dans cette lignée augmente fortement l'activation des caspases et accélère l'apoptose induite par le TNFR1. Deux mécanismes sont évoqués : soit le TNFR2 fixerait le TNF α et le transmettrait au TNFR1, soit le TNFR2 diminuerait fortement la concentration intracellulaire de TRAF2, permettant un plus grand recrutement de FADD par le complexe TNFR1/TRADD menant à l'activation des caspases [475].

Une coopération entre Fas et TNFR1 pour la délétion des lymphocytes T CD8 a été montrée *in vivo*. L'injection de fortes doses du peptide correspondant à l'antigène p33 du LCMV induit chez les souris une tolérance vis à vis de p33 qui résulte en bonne partie de la délétion des T CD8⁺ spécifiques de cet antigène. Cette délétion était partielle chez les souris TNFR1 KO, plus importante chez les souris Fas KO mais elle n'était complètement éliminée qu'en absence des deux récepteurs [478].

Enfin, l'induction d'apoptose par le TNF α a été montrée dans le cas de lymphocytes T humains issus de patients âgés qui y sont plus sensibles. Cette sensibilité est liée à

l'augmentation de l'expression de TRADD et de BAX et à la diminution de l'expression de Bcl-2 et des protéines IAP [479].

TRAIL-R / TRAIL (TNF-related Apoptosis Inducing Ligand-Receptor)

TRAIL est une protéine transmembranaire de type II qui induit l'apoptose dans une large variété de cellules dont les cellules hématopoïétiques [480]. Comme FasL et TNF α , TRAIL forme des homotrimères [481]. TRAIL peut également se retrouver sous forme soluble mais, contrairement à FasL et au TNF α , ce n'est pas une métalloprotéinase mais une cystéine protéase qui clive la forme membranaire [482]. Contrairement à FasL, TRAIL possède un domaine intracellulaire très court, 17 acides aminés contre 81 pour FasL [399]. De plus, ce domaine intracellulaire n'est pas conservé entre les différentes espèces, suggérant qu'il n'exerce pas de fonction biologique [480].

TRAIL peut être exprimé par les lymphocytes T [483] et B [484], les cellules dendritiques [485], les NKs [486], les macrophages, les monocytes [487] et les neutrophiles [488]. Il a été montré par Northern blot que TRAIL est exprimé dans de nombreux tissus dont la rate, les poumons, la prostate et le thymus [480]. Malgré son expression dans le thymus, TRAIL n'influence pas la délétion clonale des lymphocytes T. En effet des souris déficientes pour TRAIL ne montrent pas de maladie autoimmune spontanée [489].

Dans les monocytes et les cellules dendritiques, TRAIL est induit par l'IFN γ et l'IFN α mais pas par le GM-CSF, l'IL-2 ou l'IL-4 [485, 487]. Comme pour FasL, les neutrophiles possèdent une réserve intracellulaire de TRAIL prêt à être exporté à la membrane puis clivé et relargué dans le milieu extracellulaire à la suite d'un stimulus tel que du LPS ou du TNF α . Contrairement à FasL, le sTRAIL peut induire l'apoptose des cellules [490]. Les lymphocytes T naïfs n'expriment pas TRAIL mais son expression est induite lorsque les T sont stimulés par des anticorps anti-CD3 en présence d'Interferon de type I (IFN α et β)[483].

Chez l'homme, TRAIL peut se fixer à 5 récepteurs différents : TRAIL-R1 ou DR4, TRAIL-R2 ou DR5, deux récepteurs fictifs DcR1 et DcR2 et un récepteur soluble OPG (osteoprotégerin). A l'exception d'OPG, les 4 autres récepteurs sont des protéines membranaires caractérisées par la présence de 2 régions CRDs au niveau extracellulaire. Le récepteur soluble OPG semble être impliqué dans l'inhibition de l'ostéogénèse [491]. Chez la souris, on ne retrouve que le récepteur TRAIL-R2, ou mDR5 [492] et les deux récepteurs fictifs [493].

Seuls les récepteurs DR4 [494], DR5 [495] et mDR5 [492] induisent l'apoptose suite à la fixation de TRAIL, grâce à la présence d'un domaine DD, absent dans les récepteurs fictifs DcR1 et DcR2. Comme les récepteurs Fas et TNFRs, les récepteurs de TRAIL se trouvent à la surface des cellules sous forme d'homotrimères [496, 497]. L'expression des différents récepteurs sur les divers types de cellules n'est pas encore bien déterminée. Au repos, les lymphocytes T CD8⁺ expriment DcR2 de manière constitutive. Leur activation induit l'expression de Dr4 et Dr5 [498]. Les lymphocytes T CD4⁺ montrent une expression constitutive des 4 récepteurs qui peut toutefois varier si le lymphocyte T est infecté par un virus comme le HIV. On observe alors une augmentation de l'expression de Dr5 et de DcR2 [499]. Dans les cas des monocytes/macrophages, on observe une expression constitutive des 4 récepteurs mais, sans stimulation, seuls DR5 et DcR3 sont présents à la surface des cellules. Lorsqu'on stimule les monocytes et macrophages on retrouvera les 4 protéines à la surface. Un traitement par l'IFN γ augmente l'expression membranaire de DR5 tandis que DcR3 n'est pas modifié [487]. Pour les neutrophiles, on retrouve une forte expression de DcR1 ainsi que de DR5 à la surface des cellules [500].

La fixation de TRAIL sur les récepteurs DR4 et DR5 induit le recrutement de FADD et l'activation de la pro-caspase 8 et donc la voie d'apoptose extrinsèque [501]. L'apoptose induite par TRAIL peut être bloquée par les mêmes protéines inhibitrices que celles impliquées dans la voie Fas/FasL, comme cFLIP ou XIAP. DR4, DR5 et DcR2, comme les récepteurs TNFR, peuvent également recruter TRADD et RIP induisant l'activation de la voie NF- κ B [502].

Le rôle de TRAIL/TRAILR dans l'homéostasie de la réponse T CD8 a été mis en évidence *in vitro* lors de stimulations de lymphocytes T CD8 en absence de T CD4. Les CD8 qui se développent sont dits « helpless ». Ils rentreront en apoptose lors d'un nouveau contact avec leur antigène. Cette apoptose est bien liée à TRAIL puisque des T CD8+ « helpless » venant de souris KO pour TRAIL peuvent être restimulés normalement [503]. L'expression de TRAIL sur les Th2 activés induirait l'apoptose des Th1, les Th2 y résisteraient grâce à l'expression de la protéine anti-apoptotique cFLIP [504]. L'apoptose des lymphocytes T par un mécanisme impliquant TRAIL/TRAILR s'observe lors d'infections virales. Ainsi, la délétion des lymphocytes T CD4 et CD8 issus de certains patients infectés par HIV peut être bloquée *in vitro* par un anticorps anti-TRAIL alors qu'elle ne l'est pas par un anticorps anti-FasL [505].

TRAIL peut influencer le développement des tumeurs soit en induisant l'apoptose des lymphocytes T présents dans l'environnement tumoral soit en induisant l'apoptose des cellules tumorales elles-mêmes.

Chez l'homme, dans le cas du cancer du colon, une expression de FasL et de TRAIL par les cellules cancéreuses a été détectée aux stades avancés. Cette expression était corrélée avec l'entrée en apoptose des lymphocytes T CD8 dans le voisinage des cellules positives pour TRAIL [506]. Dans le cas du mélanome, on remarque que 66% des lignées de mélanomes humains sont sensibles à l'apoptose médiée par TRAIL indiquant une expression des récepteurs DR4 et DR5 par ces cellules. Pour les mélanomes fraîchement isolés, une forte variation de sensibilité à l'apoptose entre les mélanomes primaires et les métastases est observée. Les métastases expriment peu DR4 et DR5 *ex vivo* tandis que les tumeurs primaires expriment DR5 ce qui les rends plus sensibles à l'apoptose [507].

Chez des souris injectées avec un fibrosarcome, le blocage de TRAIL par des anticorps augmente le nombre de métastases hépatiques. Chez les souris non traitées, une certaine limitation de ces métastases hépatiques est due à l'expression de TRAIL par les cellules NK présentes dans le foie. En effet, la déplétion en NK diminue significativement la

survie des souris et de plus, l'administration d'anticorps anti-TRAIL chez des souris déplétées en NK n'augmente pas le nombre de métastases [508].

DR3/TWEAK

TWEAK est une protéine transmembranaire de type II dont la partie extracellulaire contient un domaine THD [509]. Comme pour les autres membres de la famille du TNF, TWEAK forme des homotrimères qui peuvent être clivés et relargués sous forme soluble [510]. De l'ARNm codant pour TWEAK est détecté dans de nombreux organes dont le cœur, le cerveau, les muscles squelettiques, le pancréas mais également au niveau de la rate, des ganglions, du thymus et des lymphocytes T circulants [510]. On détecte également une expression de TWEAK au niveau de certaines lignées tumorales humaines d'origine non lymphoïde [510] dont la lignée de cancer du colon SW480 [511]. Toutefois, malgré la présence d'ARNm, la protéine n'est détectée que sur les lymphocytes T CD4 humains [512] ou sur les monocytes humains traités à l'IFN γ [513].

Il a été décrit que TWEAK pouvait interagir avec le récepteur DR3 qui comporte, comme les autres membres TNFR, un domaine DD ainsi que des CRDs [514]. L'expression de DR3 semble, contrairement à son ligand, restreinte aux tissus riches en cellules lymphoïdes tels que la rate et le sang [515]. On le détecte sur les macrophages, les lymphocytes T et B [514] ainsi que les NK [516]. DR3 est également exprimé par des cancers du colon [517] ou des hépatocarcinomes [516].

Une étude rapporte que l'interaction entre TWEAK et DR3 pourrait induire l'entrée en apoptose de différentes lignées tumorales humaines [515]. Cependant, le fait que DR3 soit le récepteur de TWEAK est contesté par différentes équipes. En effet, il a été montré que des mutations dirigées de DR3 n'abolissaient pas l'activité biologique de TWEAK [518]. Le récepteur Fn14 (Fibroblaste growth factor-inducible 14) semble être le véritable récepteur de TWEAK. Comme les autres membres de la famille TNFR, il est constitué de 6 domaines CRDs et possède un domaine intracellulaire qui peut recruter les protéines TRAF. Toutefois le récepteur Fn14 ne possède pas de domaine DD [519]. Fn14 est détecté dans

certain types de tumeurs dont le cancer du poumon à petites cellules [520] ou le cancer du sein [521]. Par contre aucune expression de Fn14 n'est observée sur les lymphocytes T ou B [522].

L'interaction de TWEAK avec Fn14 pourrait induire directement l'apoptose de cellules cancéreuses de l'endomètre via une activation des caspases [523]. Un mécanisme plus indirect a été décrit pour la lignée Kym-1 dérivée d'un rhabdomyosarcome. TWEAK induirait l'expression de TNF α membranaire qui interagirait avec le TNFR1 à la surface de la même cellule. Une synergie entre la stimulation par TWEAK et un signal donné par le TNFR1 conduirait à une apoptose rapide et importante des cellules Kym-1 [524].

TWEAK est également décrit comme pouvant induire la prolifération [525] et la migration des cellules endothéliales [519]. De plus différents groupes montrent que TWEAK induit l'expression et la sécrétion de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-8, l'IL-6 et ICAM-1 par des astrocytes contribuant à l'inflammation du cerveau [526].

DR6

Comme les autres membres de la famille des TNFRs, DR6 possède des régions riches en Cystéine ainsi qu'un domaine DD. Le ligand de DR6 n'a pas encore été identifié [527].

DR6 est fortement exprimé au niveau des neurones et semble pouvoir interagir avec le précurseur de la β -amyloïde induisant l'apoptose des neurones, ce qui peut conduire au développement de la maladie d'Alzheimer [528].

L'immunisation de souris DR6 KO induit une hyperprolifération des Th2 sans que la réponse Th1 soit affectée. Ce phénotype ne semble pas être dû à une modification de la voie d'apoptose mais plutôt à une modification dans l'activation et la différenciation des Th2 [529]. Le même effet prolifératif a été observé pour les lymphocytes B [530].

Modèle murin de mélanome inductible TiRP-10B

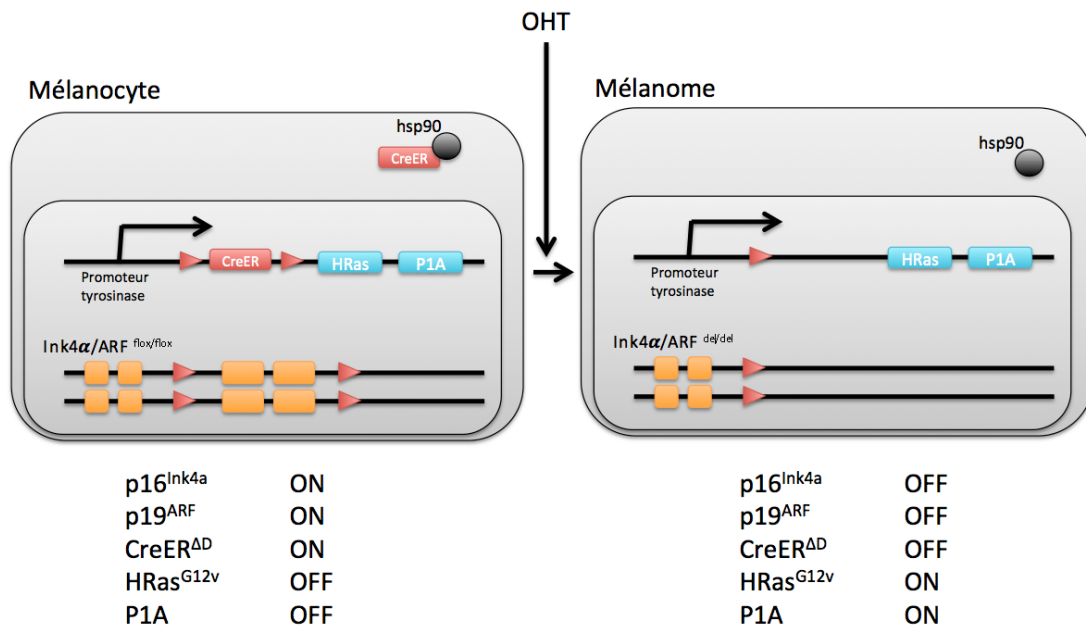
Dans de nombreux modèles murins, la vaccination contre des antigènes tumoraux induit une protection contre l'injection ultérieure d'une tumeur transplantable. Chez l'homme, la vaccination thérapeutique contre des antigènes tumoraux n'induit le rejet complet que dans une minorité de tumeurs (0,9%) [39]. Même si le transfert adoptif de lymphocytes T autologues spécifiques d'un antigène tumoral permet le rejet complet d'un plus grand nombre de tumeurs (22%) [37], ces résultats suggèrent que les modèles de tumeurs transplantables chez la souris ne reflètent pas suffisamment la situation humaine. L'étude d'un modèle de mélanomes inductibles exprimant un antigène tumoral défini devrait mieux nous éclairer sur les interactions entre la tumeur et le système immunitaire telles qu'elles se produisent chez l'homme dès le début de la transformation tumorale.

Notre laboratoire a développé une lignée de souris transgéniques (TiRP-10B) qui développent des mélanomes autologues après injections de 4OH-Tamoxifène [531]. Cette souche TiRP-10B résulte des croisements entre deux types de souris. Dans la première, les exons 2 et 3 des gènes suppresseurs de tumeurs $p16^{INK4\alpha}$ et $p19^{ARF}$ sont flanqués de deux sites LoxP [532]. La seconde contient un transgène qui comprend le promoteur de la tyrosinase spécifique des mélanocytes suivi du gène de la recombinaise Cre fusionné avec celui du récepteur aux oestrogènes, muté de manière à ne fixer que le Tamoxifène ($CreER^{\Delta D}$) ainsi qu'un signal de polyadénylation. Ces deux derniers éléments, qui sont également flanqué de deux sites LoxP, empêchent l'expression de l'oncogène Harvey-Ras^{G12V} muté ($H-Ras^{G12V}$) et du gène codant pour l'antigène tumoral P1A, situés en aval et séparés par une séquence *ires* (Figure 15). Vu la spécificité du promoteur tyrosinase, l'enzyme $CreER^{\Delta D}$ ne s'exprime que dans les mélanocytes, mais reste inactive car retenue dans le cytoplasme par la molécule chaperon, HSP90. A la suite d'un traitement avec du 4OH-Tamoxifène, l'enzyme se libère de la protéine chaperon, est transloquée dans le noyau et recombine les deux sites loxP présents. Les exons 2 et 3 des gènes suppresseurs $Ink4\alpha$ et ARF sont alors excisés, ce qui les inactive. Le traitement par le 4OH-Tamoxifène provoque

également la délétion de CreER^{ΔD} et du signal de polyadénylation ce qui permet l'expression de H-Ras^{G12V} et de P1A (Figure 15).

Figure 15 : **Représentation schématique du modèle de mélanome induit.**

OHT = 4OH-Tamoxifène. Adapté de Huijbers [531]



Les souris TiRP-10B sont par la suite re-croisées par l'équipe d'Anne-Marie Schmitt-Verhulst avec des souris B10.D2 afin d'obtenir une lignée pure qui exprime le complexe d'histocompatibilité des souris DBA/2, molécules H-2^d, avec un fond génétique Black/10. Le choix du fond génétique s'est fait en fonction d'une souris transgénique préexistante qui exprimait un TCR transgénique reconnaissant l'antigène tumoral P1A. Cette souris, ou P1ATCR B10.D2 Rag-1 KO, ne possède que des CD8 exprimant un TCR recombinant P1A (P1ATCR CD8+ T) [533].

En 2006, dans les souris TiRP-10B, 6 à 10 semaines après l'injection sous-cutanée de 4OH-Tamoxifène, près de 30% des animaux développaient des mélanomes [531]. Deux types de mélanomes étaient observés : des tumeurs pigmentées à croissance lente et des tumeurs non-pigmentées à croissance rapide [531]. Depuis, grâce à un travail de

croisements ciblés, nous avons développé des souris homozygotes pour les deux constructions qui développent une tumeur dans plus de 90% des cas. Nous observons également que la présence d'une tumeur non-pigmentée s'accompagne très souvent de la présence d'une tumeur pigmentée soit adjacente soit à distance. Les tumeurs non-pigmentées agressives pourraient résulter de la dédifférenciation de cellules tumorales pigmentées.

Le gène P1A est un gène de type « cancer-germline » qui code pour un antigène de type MAGE, l'antigène P1A₃₅₋₄₃, identifié dans la lignée de mastocytome P815 [534]. L'antigène P1A possède le même profil d'expression que les antigènes de la famille MAGE exprimés par les mélanomes humains [535, 536]. Le peptide P1A₃₅₋₄₃, LPYLGWLVF, est présenté aux lymphocytes T CD8 par la molécule d'histocompatibilité de classe I, H-2L^d [537]. Un épitope de P1A présenté aux lymphocytes T CD4 a été décrit par le groupe de Pucetti [538]. Cet épitope, P1A₃₃₋₄₄, implique un peptide de 11 acides aminés chevauchant le peptide P1A₃₅₋₄₃.

Il a été montré en 2006 par l'équipe de Liu que le peptide P1A était exprimé par différentes lignées tumorales, dont le mastocytome P815, le plasmocytome J558 et le fibrosarcome Meth A. L'injection de ces différentes lignées tumorales chez des souris immunodéficientes transférées avec des CTLs qui reconnaissent le peptide P1A indique que les tumeurs sont reconnues par les CTLs transférées et que ce transfert augmente la survie des souris. Toutefois les mécanismes d'échappement tumoral qui permet aux tumeurs de proliférer malgré la présence de CTLs anti-P1A sont différents. Les auteurs montrent que le peptide P1A est muté dans la lignée J558 permettant à la tumeur d'échapper à la reconnaissance antigénique. Une répression de l'expression peptidique est observée dans les tumeurs P815 qui échappent aux rejets tumoraux. Pour les tumeurs Meth A, on observe que malgré une activation transitoire des CTLs anti-P1A, ceux-ci ne sont plus détectés après deux semaines de transfert. Cette étude nous révèle que les mécanismes d'échappement tumoral peuvent être différents selon le modèle tumoral même s'il concerne un même peptide [539].

Différentes techniques d'immunisation contre l'antigène P1A ont été développées au laboratoire. L'immunisation de souris DBA/2 avec la lignée de leucémie L1210 syngénique transfectée avec le gène P1A complet et la molécule de co-stimulation B7-1 [540] permet le développement d'une réponse forte CD8 dirigée contre P1A. Cette réponse immunitaire est protectrice puisqu'elle permet le rejet du mastocytome P815 par plus de 50% des souris DBA/2 [541]. Toutefois l'immunisation de souris TiRP-10B avec cette même lignée ne permet pas le développement d'une réponse CD8 anti-P1A, seuls semblent être reconnus les antigènes mineurs d'histocompatibilité qui diffèrent entre L1210 d'origine DBA/2 et les souris TiRP-10B de background B10.D2.

Des protocoles de vaccination peptidique contre l'antigène P1A ont également été développés dans notre laboratoire. L'injection dans les coussinets plantaires d'une solution contenant le peptide P1A, de l'adjuvant SBAS-1c et de l'IL-12 recombinant induit chez une souris DBA/2 le développement d'une réponse CTL anti-P1A [542]. Toutefois ce type d'immunisation ne permet pas le rejet d'une tumeur transplantable P1A+ (résultat non publié). Un autre protocole de vaccination utilisant des cellules dendritiques activées *in vitro* et chargées avec le peptide P1A puis injectées dans les coussinets plantaire avec de l'IL-12 recombinant induit le développement d'une forte réponse CTL anti-P1A chez des souris DBA/2. Cette réponse CTL est quant à elle protectrice puisque qu'elle permet le rejet de 100% des tumeurs chez des souris immunisées et injectées avec la lignée P1.HTR (P1A+) [543].

Tanja Naslund a également développé un système de vaccination associant deux virus recombinants : Adeno.II-P1A_t et SFV.P1A. L'Adénovirus recombinant utilisé comporte le gène *P1A* tronqué (aa 1 → 83) ainsi que la chaîne invariante (Ii) associée au MHC de classe II. Le virus SFV.P1A utilisé est un Semliki Forest Virus recombinant comportant le gène *P1A* complet [544]. L'injection successive de ces deux vecteurs viraux permet le développement d'une réponse CD8 anti-P1A importante et protectrice puisqu'elle permet le rejet de 80% des tumeurs P1.HTR3 (P1A+) [34].

Au sein du laboratoire nous disposons de différentes techniques permettant de tracer la réponse immunitaire anti-P1A. Un tétramère spécifique des lymphocytes T CD8 qui reconnaissent l'antigène P1A₃₅₋₄₃, tétramère H-2L^d/P1A₃₅₋₄₃, a été développé [545]. Nous disposons également d'une souche de souris P1ATCR transgénique sur fond B10.D2 Rag-1 KO (Recombinaison Activating Gene 1) dont tous les lymphocytes sont des T CD8 exprimant un TCR recombinant P1A (P1ATCR CD8+ T) [533].

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire d'Anne-Marie Schmitt-Verhulst à Marseille, une lignée tumorale a été dérivée d'un mélanome induit non-pigmenté. Cette lignée transplantable, T429, est positive pour l'expression de H-Ras^{G12V} et de P1A. Elle présente également la délétion attendue de Ink4 α /ARF [546]. Nous avons cloné cette lignée transplantable et nous utiliserons les clones T429.11 et T429.6 dans nos propres expériences en comparaison avec des tumeurs induites. Les deux clones sont reconnus *in vitro* par des lymphocytes T anti-P1A de la même manière mais le clone T429.11 pousse plus vite *in vivo* que le clone T429.6.

Réponse immunitaire

Des études préalables ont montré que le système immunitaire adaptatif était important pour le contrôle du développement des mélanomes induits dans le modèle TiRP-10B. En effet, après traitement avec du 4OH-Tamoxifène, une latence plus courte (68 ± 4 jours contre 163 ± 17 jours) avant l'apparition des tumeurs est observée chez les souris immunodéficientes (Rag 1 KO) par rapport aux souris immunocompétentes [546].

Signature inflammatoire

Une analyse par cytométrie de flux des différentes populations de leukocytes présents au niveau des mélanomes induits montre une forte infiltration de cellules myéloïdes immatures dans les tumeurs non-pigmentées par rapport aux tumeurs pigmentées ou de la peau de souris contrôles. Afin d'étudier le contexte inflammatoire de l'environnement tumoral, des tumeurs non-pigmentées ont été prélevées et mises en

culture durant 48h afin de collecter les surnageants. Ceux-ci contenaient une forte concentration d'IL-6 et d'IL-10 ainsi que différentes chémokines (CCL2, CXCL1, CCL9, et CXCL12) ou facteurs de croissance (G-CSF ou VEGF). L'analyse des cytokines présentes dans le sérum indiquait plutôt une réponse immunitaire de type Th2 (présence d'IL-10, d'IL-13) qu'une réponse de type Th1 (IL-12 et IFN γ). Par analyse PCR, une expression d'Arginase a été également détectée dans les tumeurs non-pigmentées [546]. De plus, il a été observé que la croissance des tumeurs non-pigmentées était associée à une importante perturbation de l'architecture des organes lymphoïdes secondaires. Cette désorganisation rendrait difficile la rencontre entre les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T, limitant ainsi le développement d'une réponse immunitaire efficace contre les antigènes tumoraux [547].

Réponse lymphocytaire CD8

L'analyse du stroma des mélanomes induits a montré qu'il n'y avait pas d'enrichissement en CD8 par rapport à de la peau normale. Les quelques lymphocytes observés infiltraient les tumeurs non-pigmentées alors qu'ils restaient à la marge des tumeurs pigmentées.

Dans les deux types de tumeurs, la majorité des CD8 étaient CD44^{high}CD62^{low}, le phénotype des T ayant rencontré leur antigène, contrairement à ceux prélevés dans les ganglions drainants. Par contre, PD-1 n'était exprimé que sur les CD8 infiltrant les tumeurs non-pigmentées. Les T CD8 isolés de ces tumeurs n'exprimaient pas de Granzyme B contrairement à ceux présents dans des tumeurs transplantables exprimant P1A comme P815 ou T429. De plus, ils étaient incapables de produire de l'IL-2 ou de l'IFN γ après restimulation *in vitro*. Les auteurs en concluaient donc que les lymphocytes T infiltrant les mélanomes induits non-pigmentés avaient été stimulés de manière chronique jusqu'à atteindre un état d'épuisement [546].

Pour étudier l'influence du contexte inflammatoire des mélanomes induits sur l'activation et la migration des lymphocytes T, Soudja et collaborateurs ont effectué un

transfert adoptif de T CD8 TCR P1A tg naïfs. Six jours plus tard, dans les ganglions drainant les tumeurs, seule une petite fraction d'entre-eux montrait une augmentation de l'expression CD44, avait proliféré et était capable de sécréter de l'IFN γ après restimulation, contrairement aux T CD8 TCR P1A tg infiltrant une tumeur transplantable exprimant P1A (P815, T429). Bien qu'ayant perdu l'expression de CD62L, ces T CD8 TCR P1A tg transférés n'avaient pas infiltré les mélanomes induits.

Enfin les souris porteuses d'un mélanome induit non-pigmenté étaient incapables de limiter la croissance *in vivo* de la lignée transplantable T429 P1A+ alors que des souris contrôles ou porteuses d'un mélanome pigmenté l'étaient. Ceci suggère que le développement de mélanomes non-pigmentés s'accompagne d'un état d'immunosuppression important.

Ces différentes observations faites dans le modèle TiRP-10B, particulièrement chez les souris porteuses de mélanomes non-pigmentés, soulignent son intérêt comme modèle préclinique de mise au point de traitements d'immunothérapie applicables aux patients.

Objectifs

Mon travail de doctorat a consisté à développer une technique d'immunisation contre l'antigène P1A dans un modèle de mélanome inductible.

À cet effet, j'ai adapté à la souche TiRP-10B des protocoles de vaccination développés chez des souris DBA/2 et décrits comme pouvant induire le rejet d'une tumeur transplantable exprimant P1A. J'ai testé les différents protocoles en mesurant la réponse anti-P1A et j'ai sélectionné l'utilisation des virus Adeno.li.P1At et SFV.P1A comme étant le mode d'immunisation le plus efficace. J'ai par la suite étudié l'effet de cette immunisation sur la croissance tumorale.

J'ai également analysé la persistance de la réponse anti-P1A et j'ai observé sa disparition chez les souris porteuses d'une tumeur induite. J'ai donc réorienté mon travail afin de déterminer quel mécanisme d'immunosuppression pouvait induire la délétion de la réponse anti-P1A.

Résultats

Figure 16 : **Tumor incidence in immunized and non-immunized TiRP-10B^{+/+} mice.**

(A) Immunization schedule (B) TiRP-10B^{+/+} mice were immunized at day -20 with 10⁸ pfu Adeno.li.P1A and boosted at day -4 with 10⁷ IU SFV.P1A by i.d injections (▲) or left non-immunized (■). At day 0 and day 15, they were injected with 4 mg of 4OH-Tamoxifen and monitored once every week for tumor development. The figure represents the cumulative data of 5 different experiments (immunized mice n=65, median for tumor appearance = 71 days; non-immunized mice n = 56; median = 50 days). p = 0.05 by Logrank test.

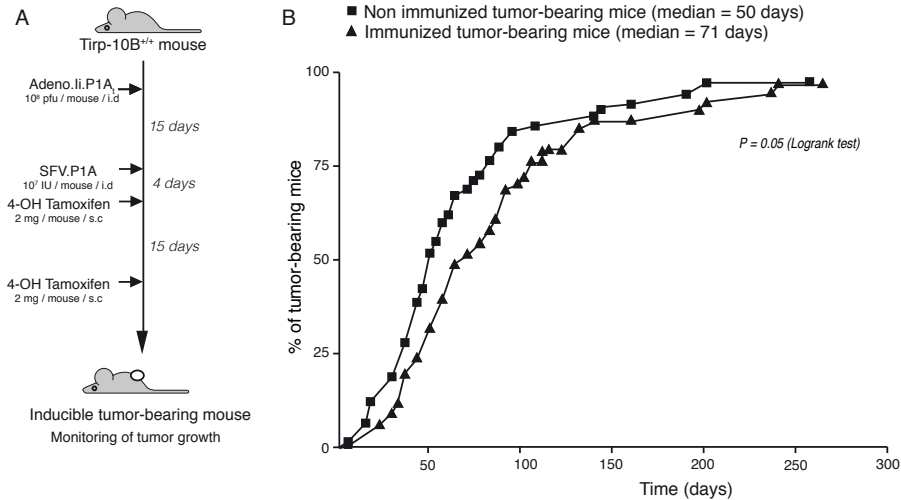
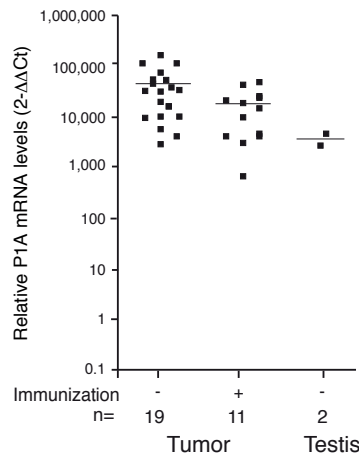


Figure 17 : **P1A gene expression**

Quantitative PCR analysis of P1A mRNA expression in tumor tissues collected from non-immunized and immunized tumor-bearing mice. P1A mRNA levels are presented as a relative quantification compared to expression in normal skin. Testis was used as positive control.



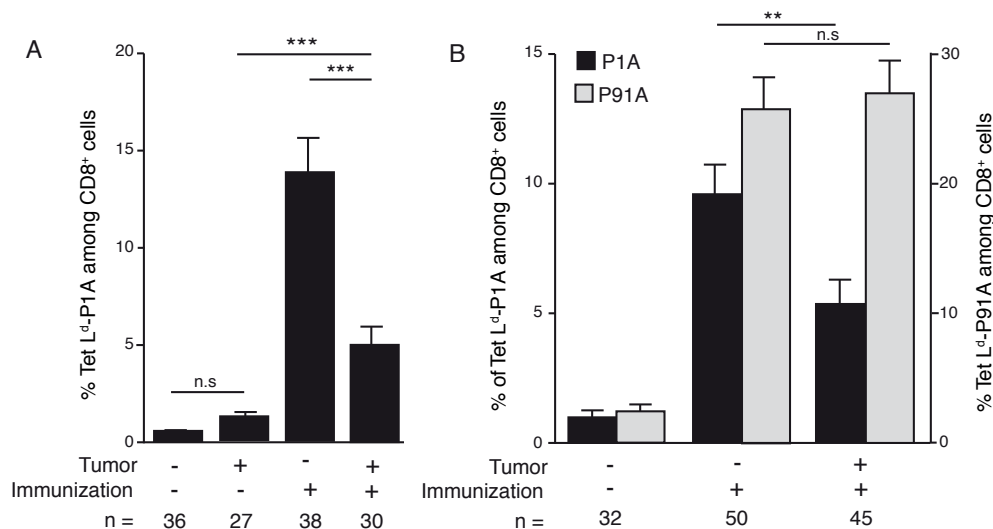
Tumor incidence in immunized and non-immunized TiRP-10B^{+/+} mice

We previously reported that a prime-boost immunization with Adeno.li.P1A_t and SFV.P1A viruses elicits a strong P1A-specific CTL response in DBA/2 mice that mediates a high protection against transplantable mastocytoma P815 [34]. We therefore applied this immunization protocol to the TiRP-10B model asking whether it could prevent or reduce melanoma development upon subsequent injection of 4OH-Tamoxifen. A group of mice was immunized with Adeno.li.P1A_t and, 15 days later, boosted with SFV.P1A. A second group received only PBS. Four days after the SFV.P1A injection, mice were treated with two doses of 4OH-Tamoxifen two weeks apart (Figure 16A). Tumor appearance was monitored once every week starting at the second 4OH-Tamoxifen injection. As shown in Figure 16B, although we observed a slight delay in tumor appearance in immunized mice (median = 71 days) as compared to controls (median = 50 days), the tumor incidence was similar in the two groups. These results indicated that anti-P1A immunization did not alter tumor incidence but only modestly delayed tumor appearance.

In some tumor mouse models, the presence of an immune response promotes the selection of less immunogenic tumors and induces a delay in tumor appearance [548]. To study the impact of immunization on antigen expression we verified the P1A gene expression by qPCR. The expression of P1A mRNA was not decreased in immunized compared to non-immunized tumor-bearing mice (Figure 17). Moreover, previous experiments showed the ability of inducible melanoma tumors to efficiently present the P1A peptide on cell surface [531]. We therefore concluded that the delay in tumor appearance in immunized mice did not result from immune selection of P1A negative variants.

Figure 18 : Tumors induce antigen-specific CD8⁺ T cells deletion

(A) TiRP-10B^{+/+} and TiRP-10B^{-/-} were immunized or not by a heterologous prime-boost Adeno.li.P1A-SFV.P1A regimen at d-20 and d-4 and TiRP-10B^{+/+} were injected with 2 doses of 4OH-Tamoxifen at d0 and d15. Mice were monitored weekly. At the time of tumor appearance, spleen cells were collected and restimulated during one week with P1A peptide-pulsed splenocytes. P1A-specific CD8⁺ T cells were then quantified by FACS analysis. (B) TiRP-10B^{+/+} and TiRP-10B^{-/-} were immunized against P1A by recombinant virus injections. Simultaneously, they were vaccinated with the P91A peptide in AS15 adjuvant (GSK) by intramuscular injection, one week apart during one month. The TiRP-10B^{+/+} mice were then treated with 4OH-Tamoxifen. When a tumor was observed in TiRP-10B^{+/+}, spleen cells from anti-P1A + anti-P91A immunized tumor-bearing or tumor-free mice were restimulated during one week with P1A or P91A peptide-pulsed splenocytes. P1A (black histograms) or P91A (grey histograms) specific CD8⁺ T cells were quantified by FACS analysis. ** P<0.005, ***P<0.0005, n.s not significant, Mann Whitney test.



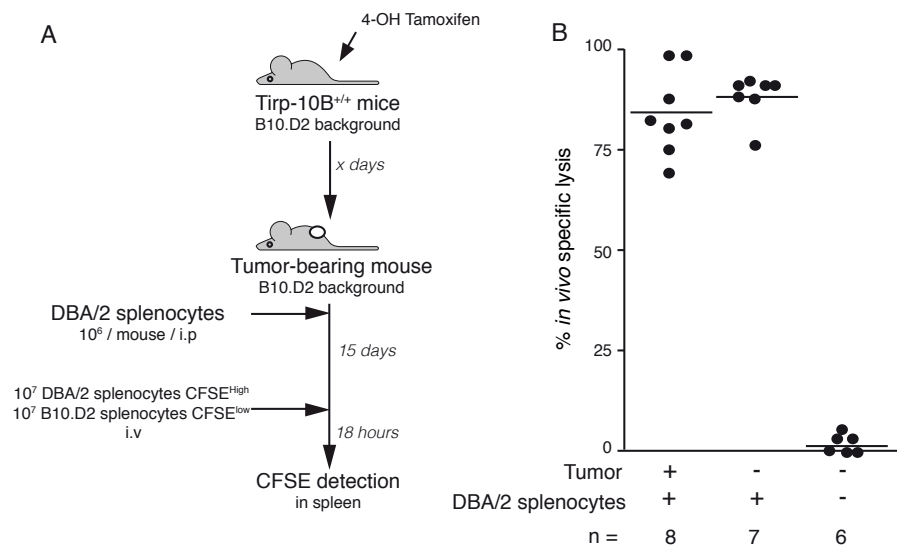
Tumors induce antigen-specific CD8⁺ T cells deletion

To understand why immunization did not affect tumor incidence we analysed the persistence of anti-P1A CTL response in tumor-bearing mice. Spleen cells from immunized or non-immunized tumor-bearing mice were collected at the time they were euthanized due to melanoma development and were restimulated *in vitro* for one week with P1A-peptide pulsed splenocytes. As controls, we used spleens obtained from immunized or non-immunized tumor free-mice. P1A specific CD8⁺ T cells were quantified by FACS analysis. As indicated in Figure 18A, immunization can induce an increase in P1A CTL specific in both tumor-bearing and tumor-free mice. However the presence of the tumor result in a significant decrease in the percent P1A-specific CTLs in immunized tumor-bearing mice as compared with immunized tumor-free mice. These data suggested the presence in the TiRP-10B^{+/+} model of a tumor-associated immunosuppression mechanism that impaired the persistence of P1A-specific CD8⁺ T cells.

To analyse whether the immunosuppression induced by the tumor was restricted to the anti-P1A response or extended to unrelated antigens, we combined the Adeno.li.P1At-SFV.P1A prime-boost with an immunization against P91A. P91A antigen is expressed by a tumor cell line derived from P815 after chemical mutagen treatment of the parental tumor [549]. This antigen is presented by H-2L^d, as P1A, and P91A-specific CTLs can be detected by the relevant tetramer. One week after the last P91A peptide injection, mice immunized against P1A and P91A were treated with 4OH-Tamoxifen. When tumors were detected, spleen cells were collected and restimulated *in vitro* with P1A or P91A peptide-pulsed splenocytes during one week. P1A or P91A specific CD8⁺ T cells were quantified by FACS analysis. As controls we used tumor-free mice immunized against both P1A and P91A. As indicated in Figure 18B, tumor development did not affect the persistence of anti-P91A specific CD8⁺ T cells but rather significantly reduced the number of P1A-specific CTL suggesting a tumor-driven specific immunosuppression.

Figure 19 : **Ability of tumor-bearing mice to mount a CTL immune response**

(A) In vivo killing assay protocol. (B) Immunization was performed by a single i.p. injection of 1×10^6 DBA/2 spleen cells in tumor-bearing and tumor-free mice. Two weeks later, DBA/2 and B10.D2 spleen cells (10^7 each) labeled with different CFSE concentrations were injected i.v. After 18h, the ratio between the two populations was determined in the spleen by FACS analysis. The percent specific lysis of DBA/2 targets is indicated.

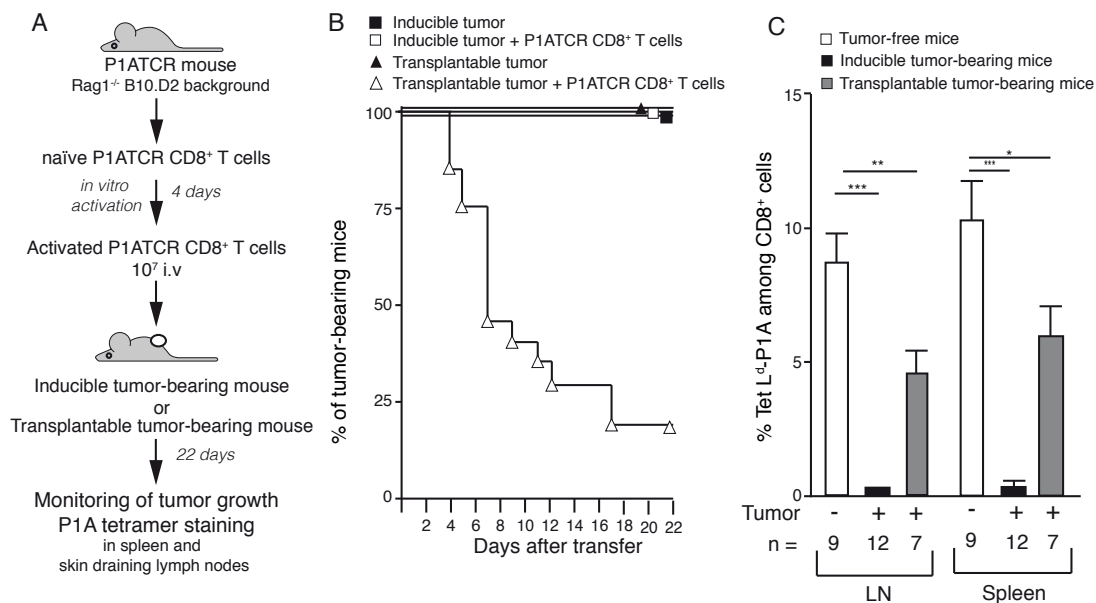


The group of Blankenstein previously described a spontaneous sporadic tumor mouse model where tumor development resulted in a general CTL unresponsiveness [550]. We thus examined if, in our model, tumor-bearing mice were still able to mount a CTL response against DBA/2 specific minor histocompatibility antigens. TiRP-10B^{+/+} tumor-bearing mice were immunized i.p with 10⁶ DBA/2 splenocytes. Two weeks later, an *in vivo* killing assay was performed by injecting 10⁷ DBA/2 and B10.D2 spleen cells labeled with different CFSE concentrations (Figure 19A). After 18h, the disappearance of CFSE-labeled cells was analysed in spleen by FACS. Immunized tumor-bearing or tumor-free mice killed the CFSE-labeled DBA/2 splenocytes with the same efficacy (Figure 19B).

Taken together these data showed that, in our inducible melanoma model, tumor development induces a specific immunosuppression of the CD8⁺ T cells that recognize the P1A antigen but not a general CTL unresponsiveness.

Figure 20 : Transferred P1ATCR CD8⁺ T cells are inefficient against inducible tumors but reject transplantable tumors

(A) Adoptive transfer protocol. (B) TiRP-10B^{+/+} mice were treated with 4OH-Tamoxifen (squares) and TiRP-10B^{-/-} were injected with 2x10⁶ T429.11 tumor cells (triangles). When tumors were observed, mice received 10⁷ activated P1ATCR CD8⁺ T cells (empty symbol) or PBS (black symbol). Tumor evolution was monitored during 22 days. (C) TiRP-10B^{+/+} mice were treated with 4OH-Tamoxifen and TiRP-10B^{-/-} were injected with 2x10⁶ T429.11 tumor cells. When tumors became palpable, tumor-bearing (black bar), T429.11-bearing (grey bar) and tumor-free (empty bar) mice were transferred with 10⁷ activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. 22 days later, spleen cells and skin draining lymph nodes were analysed *ex vivo* for P1A-specific CD8⁺ T cells by FACS using H-2L^d-P1A tetramer. ***P<0.0005, n.s, not significant, Mann Whitney test.



Tumors induce deletion of transferred P1ATCR CD8⁺ T cells

In immunized tumor-bearing mice, the numbers of P1A-specific CD8⁺ T cells were extremely low. To analyse the immunosuppression mechanism leading to their deletion, we bypassed this problem by performing adoptive transfer of P1ATCR CD8⁺ T cells.

At the time of tumor appearance, mice were transferred with 10⁷ P1ATCR CD8⁺ T cells activated 4 days *in vitro* with L1210.P1A.B7-1 irradiated cells (Figure 20A). As control for their cytolytic efficacy and persistence, we also transferred activated P1ATCR CD8⁺ T cells in mice injected with the transplantable T429.11 or T429.6 tumor cell lines established from an inducible melanoma. Inducible and transplantable tumor evolution was monitored twice a week. No signs of regression were observed for inducible tumors (Figure 20B). In contrast, 80% of the T429.11 (Figure 20B) and 100 % of the T429.6 (Figure 21A) tumors were rejected after adoptive T cells transfer.

Figure 21 : Transferred P1ATCR CD8⁺ T cells reject transplatable tumors

(A) TiRP-10B^{-/-} were injected with 2×10^6 T429.11 tumor cells (triangles) or 2×10^6 T429.6 tumor cells (round). 21 days after tumor injection when tumors were palpable, mice received 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells (empty symbol) or PBS (black symbol). Tumor evolution was monitored during 22 days. (B) TiRP-10B^{-/-} were injected with 2×10^6 T429.11 or 2×10^6 T429.6 tumor cells. When tumors became palpable, T429.11-bearing (dark grey bar), T429.6-bearing (light grey bar), and tumor-free (empty bar) mice were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. 22 days later, spleen cells and skin draining lymph nodes were analysed *ex vivo* for P1A-specific CD8⁺ T cells by FACS using H-2L^d-P1A tetramer. ***P<0.0005, n.s, not significant, Mann Whitney test.

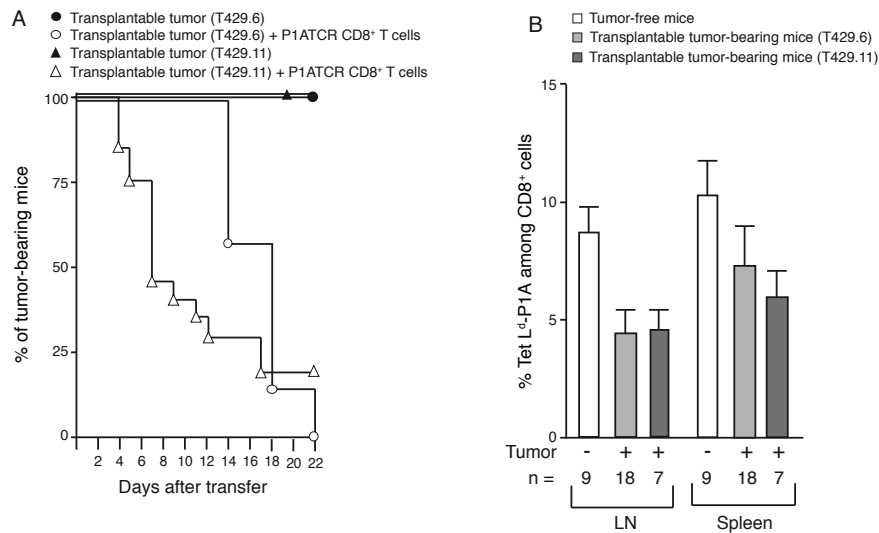
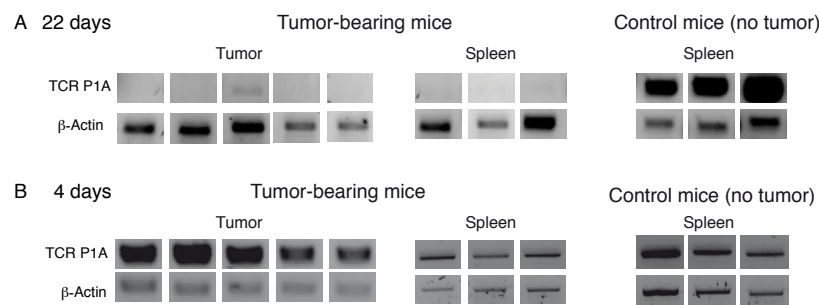


Figure 22 : P1A Tg TCR clonotypic PCR

Tumor-bearing mice were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. 4 days (B) or 22 days (A) later, tumor tissues and spleens were collected for DNA extraction. Primers recognizing the CDR3 region of P1A Tg TCR were used to amplify the TCR signal. Spleens from transferred tumor-free mice were used as controls.



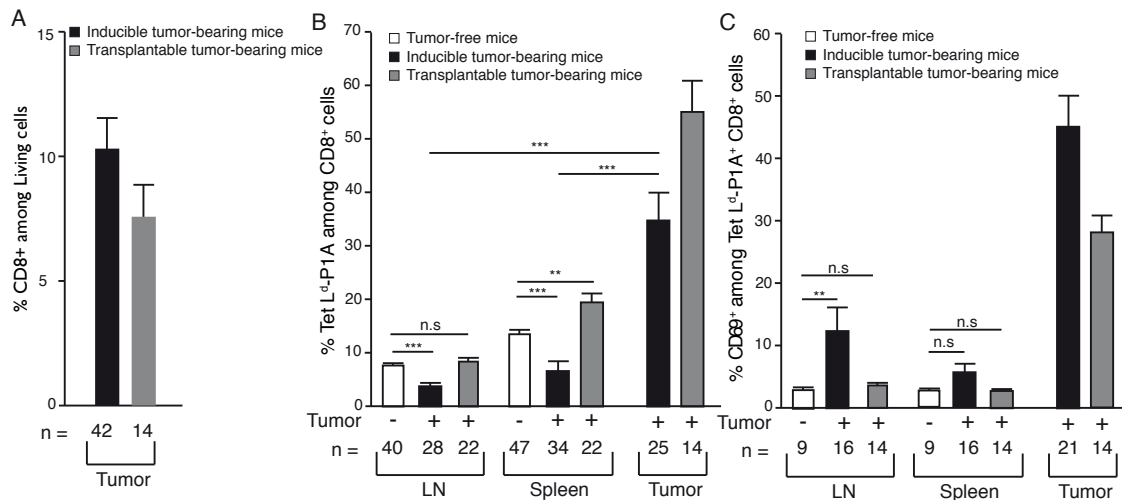
After 22 days, 50% of inducible tumor-bearing mice that received P1ATCR CD8⁺ T cells were dead, as in the control group of inducible tumor-bearing mice that did not receive any adoptive transfer. The remaining mice were sacrificed and the presence of P1ATCR CD8⁺ T cells was assessed *ex vivo* by FACS analysis. As shown in Figure 20C, in inducible tumor-bearing mice nearly no P1ATCR CD8⁺ T cells were detected in skin draining lymph nodes and spleens. In contrast, such T cells were abundant in tumor-free mice, or mice bearing transplantable tumors T429.11 (Figure 20C) or T429.6 (Figure 21B) and treated similarly.

This very low number of P1ATCR CD8⁺ T cells detected in secondary lymphoid organs could be explained by their recruitment in the tumors. We thus performed genomic PCR to evaluate the presence of the V α 8 chain coding for the P1A Tg TCR on dissociated tumor tissues and spleens. 22 days after adoptive transfer, P1ATCR CD8⁺ T cells had completely disappeared even from the tumors (Figure 22A), whereas they were clearly detectable 4 days after transfer (Figure 22B).

These results indicated that the immunosuppression mechanisms inducing deletion of P1A-specific CD8⁺ T cell after immunization were also present after an adoptive transfer.

Figure 23 : **Numbers and phenotype of P1ATCR CD8⁺ T cells 4 days after transfer**

(A) Inducible tumor-bearing (black bar) and transplantable tumor-bearing (grey bar) mice were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. 4 days later, tumors were analysed *ex vivo* for CD8⁺ T cells proportion in living cells by FACS. (B;C) Inducible tumor-free (empty bar), inducible tumor-bearing (black bar) and transplantable tumor-bearing (grey bar) mice were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. 4 days later, skin draining lymph nodes, spleens and/or tumors were analysed *ex vivo* for P1A-specific CD8⁺ T cells by FACS using H-2L^d-P1A tetramer (B) and stained for CD69 expression (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, n.s, not significant, Mann Whitney test.



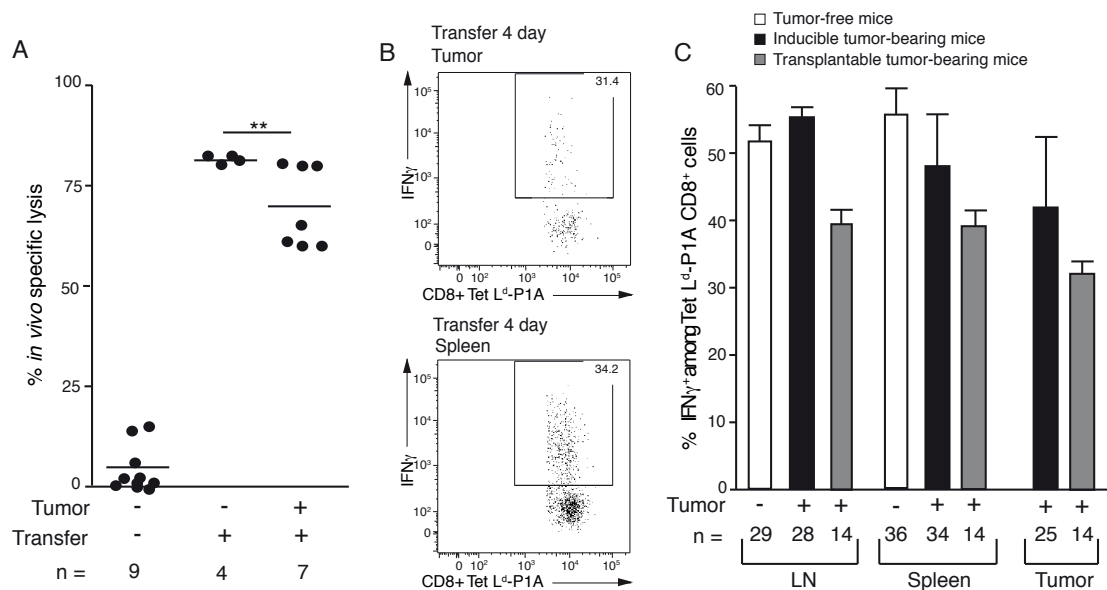
P1ATCR CD8⁺ T cells phenotype 4 days after transfer

To follow the fate of activated P1ATCR CD8⁺ T cells transferred in mice bearing an inducible melanoma, we first evaluated the proportion of CD8⁺ T cells in the tumor tissues after this transfer. Just like transplantable tumor tissues, inducible tumors contain approximately 10% of CD8⁺ T cells in the tumor living cell fraction (Figure 23A). The presence of such a significant proportion of CD8⁺ T cells in tumor tissues allows us to evaluate the distribution and activation status of P1ATCR CD8⁺ T cells in tumors and compare their status with that of P1ATCR CD8⁺ T cells in spleens and lymph nodes. As soon as 4 days after transfer we observed a significant decrease of P1ATCR CD8⁺ T cells in lymph nodes and spleens of tumor-bearing mice as compared to tumor-free mice, but a significant accumulation in the tumor tissue (Figure 23B). This observation suggested a rapid recruitment of P1ATCR CD8⁺ T cells from the secondary lymphoid organs to the tumor. Although P1ATCR CD8⁺ T cells were recruited within the tumor, they failed to induce tumor regression. These results are in striking contrast with the transplantable T429.11-model, in which P1ATCR CD8⁺ T cells are not only recruited (Figure 23B) but also induced tumor regression (Figure 20B).

Loss of activation or function of the P1ATCR CD8⁺ T cells in the inducible melanoma tumor microenvironment could explain the lack of tumor regression. We thus examined the expression of CD69, an activation marker associated with proliferation and functionality of T cells. Four days after transfer of activated P1ATCR CD8⁺ T cells, a high percentage of those T cells that were recruited at the tumor site still expressed CD69, while those present in spleens and lymph nodes had lost CD69 expression (Figure 23C). Moreover, the level of CD69 expression was higher on P1ATCR CD8⁺ T cells retrieved from inducible melanomas than from transplantable tumors. This indicated the ability of inducible melanomas to efficiently present the P1A peptide.

Figure 24 : Activity of P1ATCR CD8⁺ T cells in tumor-bearing mice

(A) Tumor-bearing and tumor-free mice were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. 3 days later, P1A or irrelevant peptide-pulsed splenocytes (10^7 each) labeled with different CFSE concentrations were injected i.v. After 18h, the ratio between the two populations was determined in the spleen by FACS analysis. The percent specific lysis of P1A peptide-pulsed splenocytes is indicated. (B-C) Tumor-bearing mice were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. 4 days later, dissociated tumor tissues and spleen cells were stimulated *in vitro* during 5 hours with L1210.P1A.B7-1 cells. IFN γ production by P1ATCR CD8⁺ T cells was analysed by FACS. Results of a representative mouse (B) or pool of different experiments (C) are illustrated. * P<0.05, ** P<0.005, ***P<0.0005, n.s, not significant, Mann Whitney test.

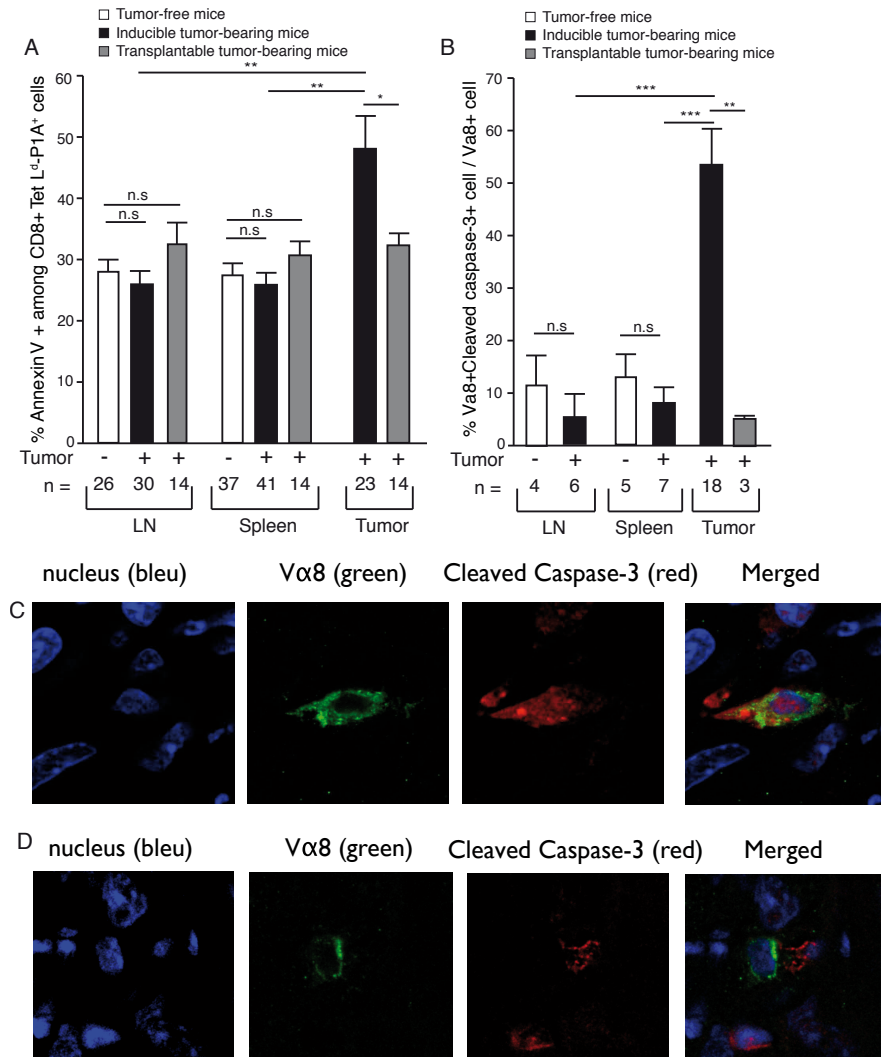


To confirm the functionality of transferred P1ATCR CD8⁺ T cells, an *in vivo* killing assay was performed after 3 days. 10⁷ P1A or P91A peptide-pulsed TiRP-10B^{-/-} spleen cells were labeled with different CFSE concentrations and injected into tumor-bearing or tumor-free mice. Eighteen hours later, specific lysis was evaluated by FACS in the spleens and lymph nodes (data not shown). Three days after transfer, P1ATCR CD8⁺ T cells present in the secondary organs of tumor-bearing mice were still able to specifically lyse P1A-pulsed targets, even though their activity was significantly lower than in tumor-free mice (Figure 24A). This difference could be attributed to the persistence of higher numbers of P1ATCR CD8⁺ T in spleens and lymph nodes of tumor-free mice (Figure 23B). To evaluate the ability of transferred P1A-specific T cells to produce IFN γ after antigenic stimulation, intracellular cytokine staining was performed. Four days after adoptive transfer, P1ATCR CD8⁺ T cells collected from dissociated tumors, spleens and skin draining lymph nodes were restimulated *in vitro* with L1210.P1A.B7-1. Five hours later, cells were labeled with anti-IFN γ antibody and analysed by FACS (Figure 24B, C). As shown in Figure 24C, $\pm$ 40% of P1ATCR CD8⁺ T collected from inducible tumor-bearing mice were able to express IFN γ , not only in the spleens and lymph nodes, but also at the tumor site.

Early after transfer, P1ATCR CD8⁺ T cells are recruited within the inducible tumors, express CD69 and retain their capacity to produce IFN γ . Moreover, the P1ATCR CD8⁺ T cells present in the spleen exhibit cytolytic effector functions. However, after 22 days, they have all disappeared from tumor tissue and secondary lymphoid organs of mice bearing an inducible melanoma.

Figure 25 : Apoptosis of P1ATCR CD8⁺ T cells 4 days after transfer.

(A) tumor-free (empty bar), inducible tumor-bearing (black bar) and transplantable tumor-bearing (grey-bar) mice were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. 4 days later, skin draining lymph nodes, spleens and tumors were analysed *ex vivo* for P1A specific CD8⁺ T cells apoptosis by FACS. (B) 4 days after adoptive transfer, skin draining lymph nodes, spleens and tumors were frozen. Immunohistochemistry analysis was performed using anti-V α 8 antibodies to detect P1ATCR CD8⁺ T cells and anti-cleaved Caspase-3 antibodies. Percent of V α 8⁺-cleaved Caspase-3⁺ among V α 8⁺ cells present in 6 random frames per tissue is represented. The numbers of P1ATCR CD8⁺ T cells analysed were respectively 277 and 267 for skin draining lymph nodes and spleens for tumor-free mice; 391, 299 and 1211 P1ATCR CD8⁺ T cells for skin draining lymph nodes, spleens and tumors for inducible tumor-bearing mice; 221 P1ATCR CD8⁺ T cells were analysed for transplantable tumors. ** P<0.005, ***P<0.0005, Mann Whitney test. (C,D) Inducible (C) or T429.11 (D) tumor tissues were labeled with anti-V α 8 (green) and anti-cleaved Caspase-3 (red) antibodies and analysed by confocal microscopy.

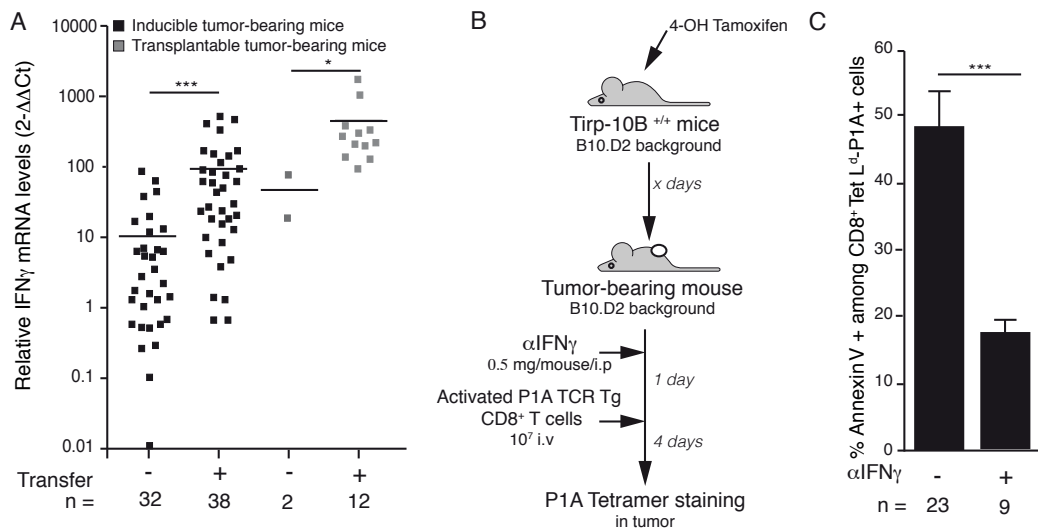


Apoptosis of P1ATCR CD8 T cells 4 days after transfer

One reason for the rapid disappearance of P1ATCR CD8⁺ T cells observed after transfer in mice bearing an inducible melanoma could be apoptosis. To quantify the proportion of P1ATCR CD8⁺ apoptotic cells, we performed an Annexin V staining in dissociated tumor tissues, spleens and lymph nodes. Four days after transfer, the percentage of P1ATCR CD8⁺ T cells that were Annexin V⁺ was significantly higher in tumor tissues compared to spleen and lymph nodes, where T cells apoptosis was equivalent to tumor-free mice (Figure 25A). In contrast, apoptosis of P1ATCR CD8⁺ T cells was not increased in transplantable T429.11 tumors (Figure 25A), despite equal recruitment and activation at the tumor site (Figure 23). To confirm and further evaluate apoptosis of the P1ATCR CD8⁺ T cells localized at the tumor site, cleaved caspase-3 stainings were performed on frozen tissues. Tissues were also stained with antibodies against the V α 8 chain present in P1ATCR CD8⁺ T cells. The ratio between V α 8⁺-cleaved caspase-3⁺ and total V α 8⁺ cells was determined in tumors, spleens and lymph nodes. The proportion of apoptotic P1ATCR CD8⁺ T cells was significantly higher in inducible tumors compared to transplantable tumors, further sustaining the FACS results (Figure 25B). Confocal microscopy was also performed on tumor tissues from mice bearing an inducible melanoma (Figure 25C) or a T429.11 transplantable tumor (Figure 25D). Staining indicated a massive apoptosis of the P1ATCR CD8⁺ T cells present in the inducible melanomas as compared to T429.11 transplantable tumors.

Figure 26 : **Role of IFN γ in P1ATCR CD8 $^+$ T cells apoptosis**

(A) Quantitative PCR analysis of IFN γ mRNA expression in inducible (black dot) or T429.11 (grey dot) tumor tissues collected from mice transferred or not with activated P1ATCR CD8 $^+$ T cells 4 days before. IFN γ mRNA levels are presented as a relative quantification compared to expression in normal skin. (B) Anti-IFN γ treatment protocol (α IFN γ) (C) Tumor-bearing mice were injected i.p with 0,5 mg anti-IFN γ mAb. One day later, they were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8 $^+$ T cells by i.v. injection. Four days after transfer, dissociated tumor tissues were analysed *ex vivo* by FACS for apoptotic cell death of P1A specific CD8 $^+$ T cells.



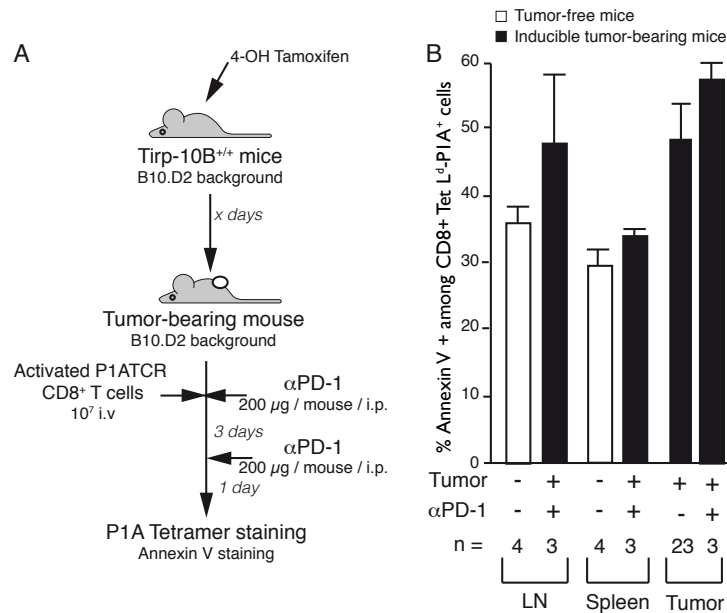
Role of IFN γ in P1ATCR CD8+ T cells apoptosis

The next question was to decipher the mechanism that triggers apoptosis of P1ATCR CD8 T cells in the inducible melanomas. We considered a potential role of IFN γ , which can play a dual role in the course of the immune response: it promotes effector T cell differentiation and MHC class I expression [551] but it also induces the expression of inhibitory molecules such as FasL [552], IDO [553], PD-L1 [554] and iNOS [555], contributing to the retrocontrol of immune responses.

IFN γ mRNA levels were measured in inducible tumors 4 days after adoptive transfer. Significantly higher levels of IFN γ mRNA were found in tumors from transferred mice as compared to non-transferred mice (Figure 26A). This indicates that in the tumor microenvironment the transferred T cells and/or the stromal cells have increased their IFN γ expression. Given the negative regulatory function of IFN γ , we tested the possible link between increased IFN γ expression and P1ATCR CD8 T cells apoptosis. Tumor-bearing mice were thus treated with an IFN γ blocking antibody the day before transfer (Figure 26B). Four days later, dissociated tumor tissues were incubated with APC-labeled Annexin V and analysed by FACS. We observed that anti-IFN γ treatment induced a very significant drop in apoptotic T cells numbers (Figure 26C), confirming a role for IFN γ in triggering T cell apoptosis at the tumor site.

Figure 27 : Role of PD-1 in P1ATCR CD8⁺ T cells apoptosis

(A) Anti-PD-1 treatment protocol (B) Tumor-bearing mice were injected i.p with 200 μ g of anti-PD-1 mAb and were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. After 3 days, a second injection of anti-PD-1 antibody was performed. The day after, dissociated skin draining lymph nodes, spleens and tumors were analysed *ex vivo* by FACS for apoptotic cell death of P1A specific CD8⁺ T cells.

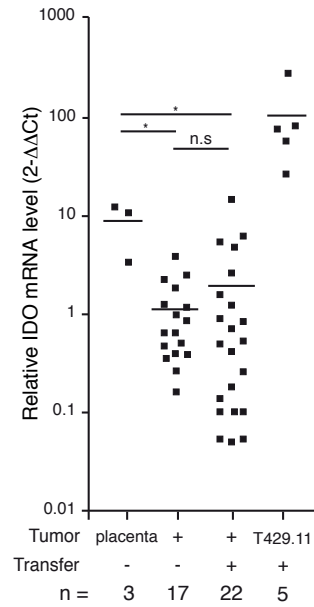


Role of PD-1 and IDO in P1ATCR CD8⁺ T cells apoptosis

Different mechanisms driven by IFN γ were tested for their implication in P1ATCR CD8⁺ T cells apoptosis. Previous experiments showed PD-L1 expression on DC and MDSC cells infiltrating the inducible melanomas [546]. Moreover, endogenous CD8⁺ T cells present in the tumor microenvironment were found to express PD-1 [546]. As P1ATCR CD8⁺ T cells were recruited into inducible melanoma and were found to recognize the P1A antigen locally, they should express PD-1 and could interact with PD-L1. Tumor-bearing mice were thus treated with a PD-1 blocking antibody the day of transfer and 3 days after (Figure 27A). Four days after transfer, dissociated tumor tissues were stained with Annexin V and analysed by FACS. However, anti-PD-1 treatment did not reduce the number of apoptotic T cells (Figure 27B).

Figure 28 : **Expression of IDO**

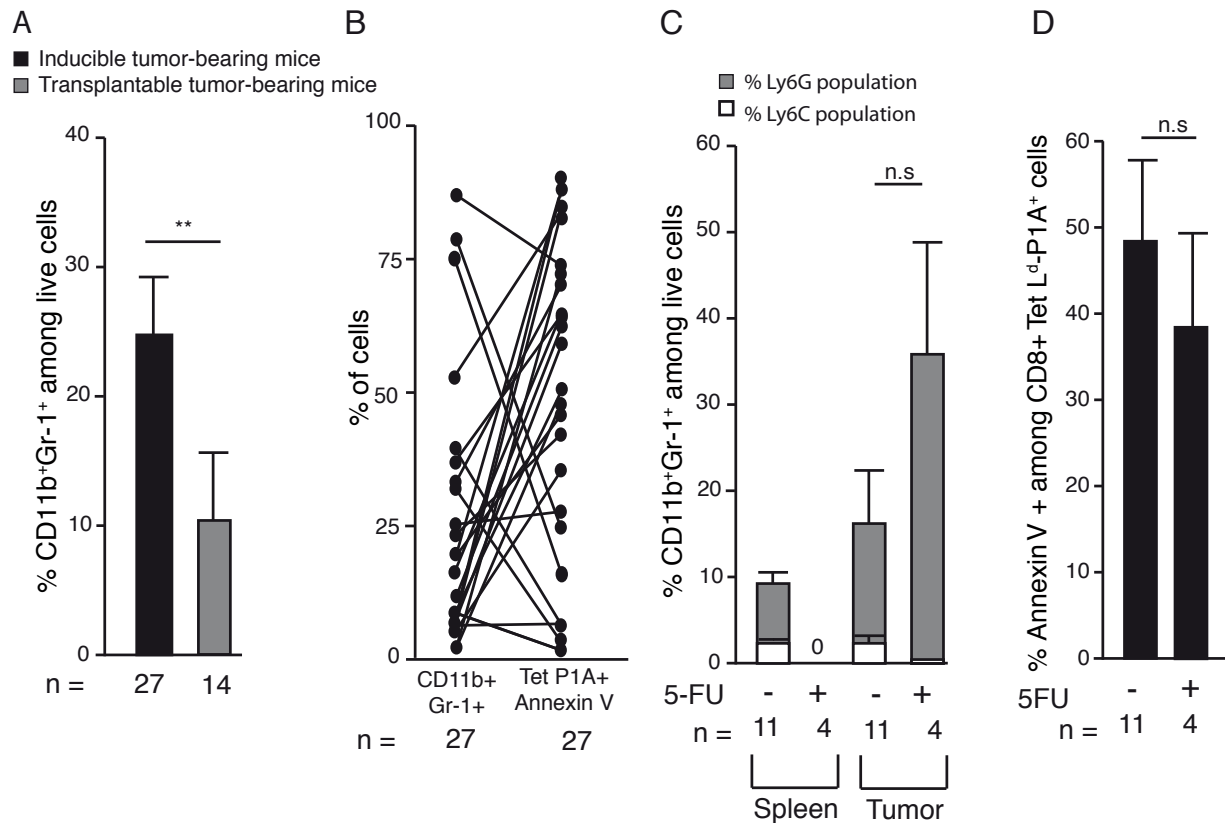
Quantitative PCR analysis of IDO mRNA expression in tumor tissues collected from mice transferred or not with activated P1ATCR CD8⁺ T cells 4 days before. Mouse placenta was used as positive control. IDO mRNA levels are presented as a relative quantification compared to expression in normal skin. ***P<0.0005, n.s, not significant, Mann Whitney test.



Beside PD-L1, IFN γ induces the expression of other immunosuppressive factors including IDO [556]. To study the possible role of IDO in P1ATCR CD8⁺ T cells apoptosis we measured its expression level by qPCR in tumor tissues collected from transferred or control mice. Expression of IDO was relatively weak in induced tumors, and was barely increased after T-cell transfer (Figure 28). We concluded that IDO was probably not playing a key role in the induction of apoptosis of tumors specific T cells in induced tumors.

Figure 29 : Role of MO-MDSC in P1ATCR CD8+ T cells apoptosis

(A;B) Inducible (black) or T429.11 (grey) tumor-bearing mice were transferred with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. 4 days later, tumors were analysed *ex vivo* by FACS for the presence of CD11b⁺Gr-1⁺ cells (A;B) or apoptotic cell death of P1ATCR CD8⁺ T cells (B) (C;D) Inducible tumor-bearing mice were treated with 0.5 mg of 5-FU by i.p. injection 2 days before transfer with 10^7 activated P1ATCR CD8⁺ T cells by i.v. injection. Four days after transfer, tumors and spleens were analysed *ex vivo* for CD11b⁺Gr-1⁺ cells (C) or for apoptotic cell death of P1ATCR CD8⁺ T cells present in tumor tissues (D). (C) The proportion of MO-MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺Ly6C⁺ _ white plot) or PMN-MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺Ly6G⁺ _ grey plot) were represented. ***P<0.0005, n.s, not significant, Mann Whitney test.



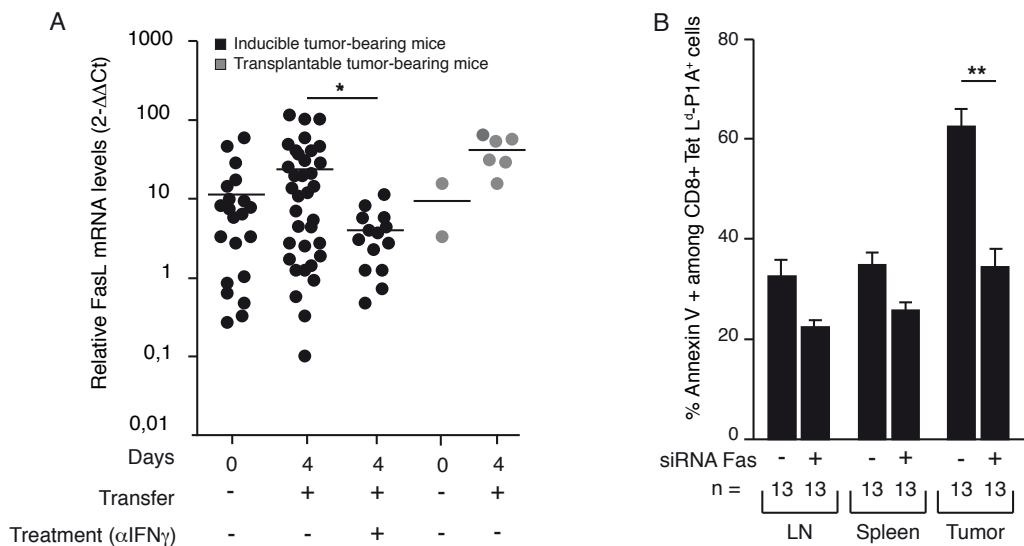
Role of MDSC in P1ATCR CD8+ T cells apoptosis

We then considered the role of MDSC, which can produce NO [557] or reactive oxygen species (ROS) [186]. These metabolites can increase T cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis. An analysis of tumors from transferred inducible tumor-bearing mice showed that MDSCs, detected by antibodies specific for CD11b/Gr-1 were significantly expanded in comparison to transferred T429.11 tumor-bearing mice (Figure 29A). Interestingly, it appeared that MDSCs expansion did not directly correlate with P1ATCR CD8+ T cells apoptosis (Figure 29B).

5-Fluororacil (5-FU) is an antimetabolite chemotherapeutic agent that targets thymidilate synthase and exerts cytotoxic effects on MDSC [558]. 5-FU was injected once in tumor-bearing mice 2 days before T cells adoptive transfer. Four days after transfer, dissociated tumor tissues and spleen were incubated with CD11b⁺/Gr-1⁺ antibodies (Figure 29C) or Annexin V (Figure 29D) and analysed by FACS. We found that treatment with 5-FU decreased the number of MDSCs only in spleen but not in the tumors (Figure 29C). In the same tumor samples, no significant decrease in the percent apoptotic P1ATCR CD8 T cell was detected. Given that MDSCs consist in two subpopulations, one granulocytic identified as Ly6G⁺ and one monocytic identified as Ly6C⁺, we evaluated the effect of 5-FU on each of them in the tumor samples. As shown in Figure 29C, pretreatment with 5-FU strongly and specifically reduced the tumor Ly6C⁺ cells, the subpopulations generally described as immunosuppressive [557]. However, Ly6C⁺ deletion after 5-FU treatment did not modify P1ATCR CD8+ T cell apoptosis in the tumor microenvironment.

Figure 30 : Role of Fas and FasL in P1ATCR CD8⁺ T cells apoptosis

(A) Quantitative PCR analysis of FasL mRNA expression in inducible (black dot) or T429.11 (grey dot) tumor tissues collected from mice treated or not with anti-IFN γ antibody and transferred or not with activated P1ATCR CD8⁺ T cells 4 days before. FasL mRNA levels are presented as a relative quantification compared to expression in normal skin. (B) Tumor-bearing mice were transferred with 10⁷ activated P1ATCR CD8⁺ T cells transfected with Fas siRNA or control siRNA by i.v. injection. After 4 days, dissociated tumor tissues were analysed *ex vivo* by FACS for apoptotic cell death of P1A specific CD8⁺ T cells. ** P<0.005 Mann Whitney test.



Role of Fas and FasL in P1ATCR CD8⁺ T cells apoptosis

We also considered FasL, another IFN γ inducible factor that is able to induce T cell apoptosis. We analysed FasL mRNA expression in tumor tissues collected from transferred tumor-bearing or control tumor-bearing mice. We observed that FasL mRNA levels were barely increased after adoptive transfer (Figure 30A) but were significantly decreased after neutralization of IFN γ (Figure 30A).

To evaluate the implication of Fas/FasL pathway in P1ATCR CD8⁺ T cells apoptosis observed in the inducible melanomas, Jingjing Zhu, a postdoc who joined the laboratory in the beginning of 2014, performed Fas silencing in P1ATCR CD8⁺ T cells by siRNA transfection. P1ATCR CD8⁺ T cells silenced or not for Fas were stimulated *in vitro* 5 days before adoptive transfer into inducible tumor-bearing mice. Dissociated tumor tissues, spleens or lymph nodes were stained with Annexin V four days later. The percent Annexin V⁺ P1ATCR CD8⁺ T cells was significantly decreased when mice were transferred with T cells silenced for Fas, indicating that the interaction of Fas with FasL plays a key role in the induction of P1ATCR CD8⁺ T cells apoptosis (Figure 30B).

Discussion

Au cours de ce travail, nous avons montré que malgré le développement d'une réponse immunitaire spécifique de l'antigène tumoral P1A chez les souris TiRP-10B dépourvues de tumeur, les mélanomes induits qui s'y développent échappent au système immunitaire. Ce phénomène d'échappement, contrairement aux modèles précédemment décrits, résulte d'une délétion des lymphocytes T CD8 anti-P1A recrutés dans l'environnement tumoral.

Nous avons également montré l'importance cruciale du choix du modèle pour le développement préclinique de protocoles d'immunothérapie en illustrant les différences majeures entre les tumeurs induites et les tumeurs transplantées.

Différences entre tumeurs transplantées et tumeurs induites

Dans notre modèle de mélanome inductible, une immunisation qui combine l'injection de deux virus recombinants codant pour l'antigène tumoral P1A n'entraîne pas le rejet des tumeurs. Nous observons plutôt une diminution du nombre de lymphocytes T CD8 anti-P1A (Figure 18A). Au contraire, le même protocole d'immunisation permet de ralentir la croissance des tumeurs transplantées et de diminuer la mortalité des souris (Stefania Cane, manuscrit en préparation). Ces derniers résultats confirment que le

protocole d'immunisation que nous avons sélectionné est efficace chez nos souris TiRP-10B d'origine B10.D2.

Une autre différence observée entre nos deux modèles est le devenir des T TCR P1A Tg pré-activés et transférés dans des souris porteuses de tumeurs. En effet, ils induisent le rejet de tumeurs transplantables alors qu'ils disparaissent chez les souris porteuses d'une tumeur induite (Figure 20*B, C*).

Ces différences sur le devenir et l'efficacité des lymphocytes T anti-P1A chez des souris porteuses d'une tumeur induite ou d'une tumeur transplantable confirment l'importance de l'utilisation du modèle de mélanome inductible pour développer un protocole d'immunothérapie efficace, applicable à l'homme.

L'utilisation du modèle inductible nous a confronté à de nombreuses difficultés au cours de ce travail. Contrairement aux tumeurs transplantables, les tumeurs induites se développent avec des temps de latence et des vitesses très variables selon les souris. De plus, plusieurs types de tumeurs se développent à la suite du traitement avec le 4OH-Tamoxifène : des tumeurs pigmentées ou des tumeurs non-pigmentées plus agressives. Les tumeurs pigmentées peuvent s'accompagner ou non de la présence d'une tumeur non-pigmentée. Dans certains cas de tumeurs non-pigmentées, on peut observer microscopiquement la présence de cellules tumorales pigmentées. La présence de mélanine limitant les analyses par cytométrie de flux.

Même si nous sommes arrivés à accroître l'incidence des tumeurs grâce à des croisements ciblés de souris TiRP-10B afin d'obtenir une lignée de souris homozygotes pour les deux transgènes, nous avons également augmenté le nombre de tumeurs spontanées qui s'y développent. Pour nous assurer que nous immunisions toutes les souris de manière préventive nous avons dû scruter minutieusement l'ensemble de nos souris pour nous assurer de détecter les tumeurs spontanées qui s'y développaient et les écarter.

Toutefois, malgré une forte hétérogénéité des tumeurs, nous avons réussi à identifier un mécanisme commun aux tumeurs non-pigmentées pouvant expliquer l'échappement des tumeurs induites. Les mélanomes qui se développent à la suite d'un traitement au 4OH-Tamoxifène subissent une pression de sélection qui favorise l'émergence de mécanismes d'échappement tumoral. Cette pression a été décrite dès 2002 par le groupe de Schreiber qui proposait que les tumeurs, au contact du système immunitaire, passent par trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement [559]. Ces mêmes mécanismes d'échappement tumoral ne semblent pas être mis en place dans la tumeur transplantable T429.11.

Même si la délétion des lymphocytes T anti-P1A que nous avons mise en évidence peut expliquer l'absence de rejet des mélanomes induits, les causes de cet échappement peuvent être multiples et ne sont pas mutuellement exclusives.

Ignorance immunitaire

L'ignorance par le système immunitaire est une des causes de la croissance des tumeurs chez un hôte immunocompétent. Dans de nombreux cas de cancer, dont le mélanome, on observe chez l'homme la présence de CTLs anti-mélaniques sans observer d'effet sur la croissance tumorale [38, 42]. Dans un modèle de fibrosarcome murin, MC57G transfecté avec la glycoprotéine GP33 du virus LCVM, l'injection de ces cellules tumorales permet l'établissement d'une réponse CTL anti-gp33 capable d'induire leur rejet. Par contre la transplantation d'un fragment de tumeur, contenant environ le même nombre de cellules tumorales que le modèle cellulaire, ne permet ni l'établissement d'une réponse immunitaire efficace ni le rejet des tumeurs. L'absence de réponse immunitaire n'est pas due à l'anergie des CTLs puisque des souris porteuses d'une large tumeur peuvent développer une réponse immunitaire anti-gp33 à la suite d'une infection avec le virus LCMV (gp33+). L'absence de réponse n'est pas non plus due à la délétion des CTLs anti-gp33. En effet, 10 jours après le transfert de lymphocytes T TCR transgéniques anti-gp33 chez des souris porteuses d'un fragment tumoral, le nombre de CTLs est similaire au nombre de CTLs présents chez des

souris contrôle. Dans le cas de ce fibrosarcome, il semblerait que l'absence de rejet tumoral soit due à l'établissement d'une zone d'immunoprivilège conduisant à l'ignorance de la tumeur par le système immunitaire [560].

Dans notre modèle de tumeur induite, nous savons que le temps de latence entre le traitement au 4OH-Tamoxifène et le développement tumoral est plus court chez les souris immunodéprimées que chez des hôtes immunocompétents, indiquant une interaction entre le système immunitaire et les tumeurs [546]. De plus, nous avons également montré que des T spécifiques de l'antigène P1A sont recrutés tant dans les tumeurs induites que dans les tumeurs transplantées (Figure 23). Les tumeurs ne sont donc pas ignorées par le système immunitaire dans notre modèle. De plus, contrairement au modèle de fibrosarcome MC57G, nous observons la délétion des CTLs anti-P1A chez les souris porteuses d'une tumeur induite par rapport aux souris contrôle ou porteuses d'une tumeur transplantée.

Perte de la reconnaissance antigénique

La diminution de l'expression des antigènes tumoraux ou des molécules MHC est souvent proposée comme mécanisme d'échappement tumoral. Dernièrement, l'équipe de Tyler Jacks [561] a montré chez des souris porteuses d'un sarcome induit, l'apparition d'une réponse immunitaire persistante et fonctionnelle contre les antigènes tumoraux sans régression tumorale. L'analyse des tumeurs a montré une diminution de l'expression des molécules H-2 ainsi que de l'expression des antigènes [561]. Nous savons que les tumeurs induites expriment de l'ARNm codant pour l'antigène P1A (Figure 17) et que l'antigène est correctement présenté dans l'environnement tumoral. En effet, des T TCR P1A Tg isolés des tumeurs expriment le marqueur d'activation CD69. Il semblerait donc que ce n'est ni une diminution de l'expression du peptide P1A ni de l'expression des chaînes H-2 qui soit la cause de l'échappement tumoral.

Paralysie des lymphocytes T

Dans le modèle transgénique de tumeurs sporadiques de Blankenstein [550, 562], l'absence de rejet tumoral est lié à la paralysie des lymphocytes T. Les tumeurs qui s'y développent expriment la protéine SV40 Tag dont dérive l'antigène SV40-T ou Tag. Les auteurs distinguent deux types de tumeurs : des lésions pré-cancéreuses qui se développent à des âges précoces et qui ne sont pas macroscopiquement détectables et des tumeurs tardives qui ont évolué au cours du temps en présence du système immunitaire. L'apparition d'une tumeur s'accompagne de la présence d'anticorps anti-Tag, sans le développement d'une réponse CTL anti-Tag [550]. En présence d'une tumeur tardive, l'immunisation contre un antigène irrelevant, tel que l'antigène HY ou gp33, ne permet pas le développement d'une réponse immunitaire capable d'éliminer une cible qui exprime ces antigènes. Blankenstein observe donc le développement d'une paralysie généralisée des lymphocytes T qui reconnaissent ou non un antigène tumoral [550]. Dans notre modèle de mélanome induit, nous observons qu'en présence d'une tumeur, les souris TiRP-10B conservent leur capacité à développer une réponse immunitaire contre des antigènes irrelevantes et à éliminer une cible les exprimant (Figure 19).

Blankenstein associe ce mécanisme d'immunosuppression à l'augmentation du TGF β 1 dans le sérum des souris porteuses de tumeur ainsi que celle du nombre de MDSCs au sein de la rate et des tumeurs. Dans le modèle TiRP-10B, il a été montré par Stefania Cane que les cellules tumorales qui dérivent des tumeurs induites produisent du TGF β 1 *in vitro* et *in vivo* (manuscrit en cours de préparation). Toutefois nous pouvons exclure le rôle de cette cytokine dans le mécanisme d'immunosuppression que nous observons dans notre modèle. En effet des expériences réalisées *in vivo* avec l'anticorps 1D11 bloquant le TGF β dont le TGF β 1 ne permettent pas d'augmenter l'efficacité de la réponse anti-P1A. De plus l'administration de l'anticorps 1D11 en combinaison avec un transfert adoptif de T TCR P1A Tg ne permet pas de diminuer leur entrée en apoptose (Stefania Cane, manuscrit en préparation).

Délétion des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux

Au-delà de la simple paralysie des lymphocytes T anti-P1A, nous observons la disparition des lymphocytes T anti-P1A chez les souris porteuses d'un mélanome induit.

Dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire induit qui exprime la protéine OVA dont dérivent les antigènes SIN et SIY, l'équipe de Tyler Jacks a montré que le développement tumoral s'accompagnait du développement d'une réponse immunitaire transitoire. Le déclin des lymphocytes T endogènes anti-SIN et anti-SIY s'accompagne d'une diminution de leur capacité à produire d'IFN γ et du TNF α laissant penser que les CTL acquièrent un phénotype épuisé [563]. Grâce au transfert de lymphocytes T transgéniques anti-SIN et anti-SYN naïfs, ils montrent une prolifération des lymphocytes T qui ne s'accompagnent pas de leur activation. L'épuisement lymphocytaire serait dû une présentation sub-optimale des antigènes SIN et SYN au niveau des ganglions drainant la tumeur. S'ils transfèrent des lymphocytes T transgéniques anti-SIN activés *in vitro*, ils montrent que les lymphocytes T conservent leur activité (production d'IFN γ et de TNF α) durant au moins 12 jours. L'épuisement des lymphocytes T au niveau des mélanomes induits est une des hypothèses émises par Saidi Soudja pour expliquer l'absence de réponse immunitaire chez les souris TiRP-10B. Saidi Soudja montre que les lymphocytes T CD8 endogènes présents au niveau des tumeurs ne produisent plus d'IL-2 et d'IFN γ [546]. Toutefois, la présentation sub-optimale des antigènes tumoraux au niveau de la tumeur et des ganglions drainant pourrait expliquer le phénotype épuisé des lymphocytes T endogènes mais n'explique pas l'absence de prolifération des T TCR P1A Tg naïfs transférés chez des souris porteuses d'une tumeur induite [546]. De plus, l'épuisement lymphocytaire n'explique pas la disparition des T TCR P1A Tg activés 22 jours après le transfert.

Dans un modèle d'immunisation, Hailemichael et ses collaborateurs étudient le devenir de CD8 transgéniques spécifiques de l'antigène gp100 (lymphocytes T pmel-1) ainsi que le devenir de CD8 transgéniques spécifiques de l'antigène OVA. Ils montrent que le transfert de lymphocytes T pmel-1 suivi d'une immunisation avec le peptide gp100

émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) permet une amplification transitoire des lymphocytes T pmel-1 [552]. Ils observent non seulement une séquestration des lymphocytes T pmel-1 au niveau du site de vaccination mais également une entrée en apoptose de ces T. En effet, 6 jours après le transfert, 43% des lymphocytes T anti-gp100 sont en apoptose. L'entrée en apoptose des T est restreinte au site de vaccination. Ils montrent que l'entrée en apoptose des lymphocytes T dépend de l'engagement de leur TCR ainsi que de l'expression du récepteur de mort cellulaire Fas. La réalisation d'un transfert adoptif avec des lymphocytes T anti-OVA déficiente pour l' IFN γ et immunisée contre OVA+IFA montre que l'expression de Fas dépend de la production d' IFN γ . Enfin, ils montrent une diminution de l'apoptose des lymphocytes T pmel-1 chez des souris déficiente pour FasL. L'ensemble de ces résultats suggère que les CD8 anti-gp100 sont recrutés au niveau du site de vaccination où ils rencontrent leurs antigènes, s'activent et entrent en apoptose par un mécanisme dépendant de l' IFN γ et du récepteur Fas. A la vue de cette étude, nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes T recrutés au niveau de l'environnement tumoral entrent en apoptose à la suite de leur activation et de l'expression du récepteur de mort cellulaire en présence d' IFN γ . Dans un premier temps, nous avons montré une augmentation de l'expression d' IFN γ dans l'environnement tumoral à la suite d'un transfert adoptif (Figure 26A). Par la suite, l'inhibition de cet IFN γ permettait une diminution de l'entrée en apoptose des T transférés (Figure 26C). Enfin, Jingjing Zhu a confirmé notre hypothèse en montrant que la répression de Fas, grâce à un siRNA, diminuait l'entrée en apoptose des lymphocytes T recrutés au niveau des tumeurs induites. Grâce à des TaqMan, nous avons également montré une expression de FasL dans l'environnement tumoral des tumeurs induites (Figure 30).

Mais le rôle de FasL dans la réponse anti-tumorale est complexe. En effet la voie Fas/FasL est utilisée par les lymphocytes T et les NK pour induire l'entrée en apoptose des cellules tumorales en complément de la voie des granzymes et des perforines [486]. Par ailleurs, FasL peut être exprimé dans l'environnement des tumeurs soit par les cellules tumorales [431], soit par les MDSCs [552], soit par les cellules endothéliales [441] ou encore par les lymphocytes T eux-mêmes. Nous avons donc cherché à identifier les cellules

qui exprimaient FasL dans les mélanomes induits et à comprendre pourquoi nous n'observons pas l'apoptose de T TCR P1A Tg malgré une expression de FasL dans les tumeurs transplantées (Figure 30).

Les MDSCs

Les MDSCs forment une population de cellules myéloïdes immatures qui se trouvent à différents stades de différenciation, chez des patients atteints de cancer, et qui peuvent inhiber les réponses immunitaires. Une étude réalisée chez 97 patients porteurs d'un mélanome montre une corrélation inversée entre le nombre de MDSCs et l'absence de lymphocytes T anti NY-ESO-1 ou Melan-A [564]. Les auteurs émettent l'hypothèse que la présence des MDSCs durant la phase d'expansion des lymphocytes T réduit leur prolifération, se traduisant par une absence de lymphocytes T [564]. Les MDSCs possèdent différents mécanismes pour inhiber la réponse immunitaire [183]. Elles peuvent induire une diminution de la prolifération des lymphocytes T ou l'apoptose des T en exprimant, par exemple, FasL.

Comme nous l'avons déjà mentionné, dans le modèle d'Hailemichael [552], le transfert adoptif de lymphocytes T pmel-1 chez une souris immunisée contre l'antigène gp100 en présence d'adjuvant incomplet de Freund permet le développement transitoire d'une réponse CTL contre gp100. L'utilisation de l'adjuvant incomplet de Freund provoque en plus de la séquestration des lymphocytes pmel-1, le recrutement des deux types de MDSCs, les PMN-MDSCs et les MO-MDSCs. Dans son modèle, Hailemichael et ses collaborateurs montrent que les MO-MDSCs expriment FasL et PD-L1 en présence d'IFN γ et que c'est l'expression de ces deux molécules qui induit l'entrée en apoptose des CTL anti-gp100. D'autres études montrent également que la fonction immunosuppressive des MDSCs est influencée par l'IFN γ produit par les lymphocytes T en réponse à leurs antigènes [565]. Pour rappel, nous avons montré que la neutralisation de l'IFN γ grâce à un anticorps bloquant permettait une diminution de l'entrée en apoptose des T TCR P1A Tg (Figure 26) ainsi qu'une diminution de l'expression de FasL dans l'environnement tumoral (Figure 30).

Nous avons dès lors cherché à dépléter les MDSCs dans nos souris porteuses de tumeurs induites. Contrairement au résultat obtenu par l'équipe de Ghiringhelli dans le modèle du thymome El-4 [558], nous avons montré que le 5-FU supprimait, dans l'environnement tumoral, la population de MO-MDSCs mais n'avait pas d'effet sur la population de PMN-MDSCs. Nous avons montré que l'inhibition de la population de MO-MDSC n'influençait pas l'entrée en apoptose des T TCR P1A Tg (Figure 29).

Nous avons donc tenté d'éliminer la population de PMN-MDSCs en utilisant des liposomes clodronates. Les liposomes clodronates peuvent être phagocytés par les macrophages et les MDSCs provoquant leur apoptose [566] [567]. Toutefois, les différentes expériences réalisées au laboratoire ont montré que l'utilisation des liposomes clodronates induisait non seulement la délétion des macrophages et des MDSCs dans l'environnement tumoral mais également une diminution du nombre de lymphocytes T TCR P1A Tg recrutés dans l'environnement tumoral. Nous n'avons donc pas pu étudier l'impact de l'absence des deux populations de MDSCs sur l'apoptose des lymphocytes T.

Grâce à ces expériences utilisant les liposomes clodronates, nous avons montré que l'environnement tumoral était essentiel à la disparition des lymphocytes T TCR P1A Tg. Dans ces expériences, nous avons observé qu'à la suite d'un traitement avec des liposomes clodronates et d'un transfert adoptif, il n'y avait pas de diminution du nombre de lymphocytes T TCR P1A Tg au niveau des ganglions drainant la peau ou au niveau de la rate des souris porteuses de tumeurs par rapport à des souris naïves. Nous concluons donc que la diminution du nombre de lymphocytes T au niveau des organes lymphoïdes secondaires chez les souris porteuses de tumeurs et non traitées avec des liposomes clodronates est due à un recrutement massif des T TCR P1A Tg au niveau de la tumeur où ils entrent en apoptose.

Parallèlement, nous avons tenté de détecter par cytométrie de flux l'expression de FasL sur les PMN-MDSCs et sur les MO-MDSCs. Mais l'utilisation des anticorps anti-FasL est sujette à de nombreuses controverses [568]. Le clone MFL-3 et le clone KAY10 ont été

décrits comme pouvant être utilisés pour marquer la forme extra-cellulaire de FasL par cytométrie de flux. Dans un premier temps, nous les avons testés sur des lymphocytes T TCR P1A Tg stimulés *in vitro*, dont l'expression de FasL avait été vérifiée par PCR. Nous avons observé une augmentation de la fluorescence en présence du clone MFL-3 mais nous retrouvons la même augmentation lorsque les cellules sont marquées avec l'isotype contrôle. Pour le clone KAY10, nous ne détectons aucun marquage. Nous avons toutefois testé l'anticorps MFL-3 sur des cellules CD11b⁺Gr-1⁺ issues de tumeurs induites sans obtenir plus de résultats qu'avec les T TCR P1A Tg. Ces deux anticorps ne nous permettent pas de vérifier l'expression de FasL par les MDSCs. Le troisième anticorps couramment utilisé est l'anticorps polyclonal N-20 qui est recommandé pour marquer le FasL intra-cellulaire par des techniques d'immunofluorescence autres que la cytométrie en flux [441]. Nous avons tenté de réaliser des marquages en immunofluorescence mais nous avons un important bruit de fond. Toutefois, dans le passé, cet anticorps a été décrit comme n'étant pas spécifique de FasL puisqu'il reconnaît autant les cellules transfectées avec FasL que les cellules contrôle [568, 569]. Afin d'éviter d'introduire une erreur dans nos résultats, nous avons préféré ne pas utiliser les anticorps contre FasL dans nos expériences tant que nous ne sommes pas sûrs de leurs spécificités. Jing Jing Zhu tente à l'heure actuelle de produire une lignée stable qui exprimerait FasL.

Enfin, nous avons tenté d'étudier l'expression de FasL dans la population de MDSCs. Pour cela nous avons réalisé un tri cellulaire dirigé contre CD11b et Gr-1 et nous avons effectué une RT-PCR dirigée contre FasL. Des résultats préliminaires, qui doivent encore être confirmés ne nous montrent pas d'expression de FasL dans les cellules myéloïdes.

Hailemichael et ces collaborateurs émettent l'hypothèse d'un éventuel rôle de la voie PD-1/PD-L1 dans l'apoptose des CTL anti gp-100 en complément de la voie Fas/FasL. Nous avons donc inhibé cette voie grâce à un anticorps bloquant le récepteur PD-1 mais nous n'avons pas observé de différence sur l'entrée en apoptose des lymphocytes T (Figure 27).

Les cellules tumorales

FasL peut également être exprimé par les cellules tumorales. *In vitro*, de nombreuses tumeurs expriment FasL et induisent l'entrée en apoptose des lymphocytes T [570, 571] [572]. Différentes études montrent un rôle similaire de FasL *in vivo*. Gimmi et ses collaborateurs analysent les mécanismes d'échappement tumoral dans un modèle murin transgénique d'adénocarcinome mammaire qui se développe spontanément à la suite d'une gestation [570]. Ces tumeurs expriment l'antigène rNeu. L'immunisation avant gestation grâce à des fibroblastes exprimant rNeu protège les souris contre le développement d'un adénocarcinome. Dans certains cas, certaines tumeurs se développent tardivement et ce malgré une immunisation. Les auteurs montrent que les tumeurs expriment l'antigène rNeu mais elles expriment également de manière constitutive FasL, ce qui conduit à l'apoptose des lymphocytes T infiltrant les tumeurs et l'absence de rejet tumoral [570].

Toutefois l'expression de FasL par les cellules tumorales et son rôle dans l'apoptose des lymphocytes T *in vivo* sont fort controversés surtout en raison des problèmes techniques [573] [574]. En 1996, Hahne et ses collaborateurs montrent une expression de FasL dans 10 tissus tumoraux dérivant de mélanome [431]. Ces auteurs montrent également que l'expression de FasL par la lignée de mélanome murin B16 est associée à une croissance plus rapide de la tumeur. Ceci leur permet de conclure que l'expression de FasL par les cellules tumorales provoque l'échappement tumoral par induction d'apoptose des lymphocytes T infiltrant la tumeur [431]. Mais en 1999, il a été montré que sur 26 mélanomes étudiés, aucun n'exprimaient FasL [440]. Les résultats obtenus par Hahne et ses collaborateurs peuvent s'expliquer soit par l'utilisation de primer intra intron qui ne permet pas de distinguer l'ARNm de l'ADN, soit par l'utilisation des tumeurs fraîchement isolées qui peuvent être contaminées par des lymphocytes T où des cellules endothéliales pouvant exprimer FasL.

Afin de conclure sur l'expression de FasL par les cellules tumorales dérivant de mélanomes induits nous devrions réaliser des RT-PCR sur des lignées tumorales amplifiées *in vitro*. Cette étape permettrait d'éliminer d'éventuelles contaminations par des cellules

immunitaires ou du stroma qui pourraient exprimer FasL. Toutefois, nous avons montré que l'IFN γ est lié à l'expression de FasL dans l'environnement tumoral. Il se pourrait donc que nous ne détectons pas d'expression de FasL par les cellules tumorales en absence de cytokines inflammatoires. Il a été montré que le traitement de la lignée de carcinome colorectal HT29 et de la lignée d'adénocarcinome mammaire MCF7 avec de l'IFN γ et du TNF α induit, *in vitro*, une expression de FasL à la surface des cellules tumorales [575]. Le traitement de la lignée T429.11 ou de lignée tumorale fraîchement isolée avec différentes concentrations d'IFN γ ou de TNF α nous permettrait de savoir si les mélanomes induits peuvent exprimer FasL. Si nous détectons par PCR une expression de FasL nous pourrions réaliser un test de survie des lymphocytes T. Ce test de survie permettrait dès lors de nous assurer que les lignées de mélanome peuvent traduire la protéine FasL et qu'elles peuvent l'exporter correctement à leur membrane.

Les cellules endothéliales

Dernièrement Gregory Motz et ses collaborateurs ont montré, dans des tumeurs ovariennes humaines, que les cellules endothéliales présentes au niveau des tumeurs pouvaient exprimer FasL et que cette expression induisait la mort des lymphocytes T effecteurs [441]. Ils ont également montré que chez des souris porteuses d'une tumeur, l'inhibition de l'angiogenèse tumorale grâce à des facteurs bloquant celle-ci permettait une augmentation de l'infiltrat lymphocytaire dans les tumeurs. Dans le modèle de mélanome induit, l'induction d'apoptose par les cellules endothéliales est peu probable. En effet nous avons montré, ainsi que l'équipe d'Anne-Marie Schmitt-Verhulst, par analyse immunohistologique que les quelques lymphocytes T endogènes présents dans les tumeurs non pigmentées se trouvaient principalement dans la masse tumorale et non en périphérie [546]. De plus, nos marquages dirigés contre la chaîne V α 8 des T TCR P1A Tg sur des tissus tumoraux provenant de souris ayant reçu un transfert, montrent une distribution homogène des lymphocytes T dans la masse tumorale. Contrairement au modèle de Motz, il semblerait que, dans le modèle de mélanome induit, les cellules endothéliales ne limitent

pas l'infiltration tumorale par des lymphocytes T et ne soient pas responsables de leur entrée en apoptose.

Les lymphocytes T régulateurs

Comme nous l'avons décrit, les lymphocytes T régulateurs peuvent induire la paralysie des lymphocytes T mais également la délétion des lymphocytes T CD8+ [106]. Une étude réalisée chez des patients atteints d'un hépatocarcinome a montré que les lymphocytes T CD4⁺Foxp3⁺ pouvaient exprimer FasL et induire l'entrée en apoptose des T CD8 circulants [576]. Saidi Soudja a montré la présence de lymphocytes T CD4⁺Foxp3⁺ au niveau des tumeurs induites [553]. Même si nous ne détectons pas d'augmentation du nombre de lymphocytes Treg au niveau des tumeurs à la suite d'un transfert adoptif (Stefania Cane, manuscrit en préparation), nous pourrions combiner le transfert adoptif avec une injection préalable de protéine IL-2 fusionné à la toxine diphtérique qui déplete de manière spécifique les lymphocytes Treg [577] et étudier la survie des T TCR P1A Tg. L'inhibition de la population de Treg nous permettrait d'exclure un potentiel rôle de cette population dans l'entrée en apoptose des lymphocytes T.

Les lymphocytes T CD8

Pour rappel, FasL est un des mécanismes cytotoxiques utilisés par les lymphocytes T pour éliminer une cible mais il est également impliqué dans le contrôle de l'homéostasie de la réponse immunitaire. En effet, l'activation des lymphocytes T à la suite de leur reconnaissance antigénique induit non seulement l'expression de Fas mais également de FasL, sensibilisant les lymphocytes T à l'apoptose cellulaire.

À l'heure actuelle, nous ne pouvons pas conclure sur l'expression de FasL par les lymphocytes T présents au niveau des tumeurs. Grâce à des RT-PCR, nous savons que les T que nous transférons expriment FasL mais nous ne savons pas si cette expression est maintenue *in vivo*. Nous devrions purifier, à partir de fragments tumoraux, les T TCR P1A Tg

ainsi que les CD8 endogènes, 4 jours après un transfert adoptif et réaliser des RT-PCR dirigés contre FasL. Jingjing Zhu, Marine Blackman et Marie Solvay essayent également de réaliser des transferts adoptifs avec des T TCR P1A Tg réprimés pour FasL grâce à un siRNA. Toutefois, nous devons garder à l'esprit que de nombreux lymphocytes T endogènes, qui peuvent exprimer FasL, sont recrutés dans l'environnement tumoral suite au transfert adoptif et que ces lymphocytes T pourraient induire l'apoptose de T TCR P1A Tg. Pour cette raison, il serait intéressant de réaliser ces expériences *ex vivo* sur des coupes de tumeurs fraîchement isolées et mises en culture durant 4 jours avec les T TCR P1A Tg réprimés pour FasL. Nous pourrions également réaliser des transferts adoptifs avec des T TCR P1A Tg réprimés ou non pour FasL dans des souris TiRP-10B Rag-1 KO développées à Marseille [546] et étudier l'effet de ce transfert sur le développement tumoral. Ces expériences nous permettraient de conclure si oui ou non l'apoptose des lymphocytes T recrutés dans l'environnement tumoral est dû à l'expression de FasL par les lymphocytes T ou si c'est un autre type cellulaire qui exprimerait FasL.

L'expression de FasL dans l'environnement tumoral ne semble pas être la seule cause de l'entrée en apoptose des lymphocytes T. En effet, nous avons remarqué une expression de FasL dans les tumeurs transplantables et ce en même quantité que dans les tumeurs induites (Figure 30). Il semblerait donc qu'un autre mécanisme en complément de la voie Fas/FasL soit nécessaire pour que les lymphocytes T entrent en apoptose dans l'environnement des tumeurs.

Comme nous l'avons évoqué dans notre introduction, quatre autres récepteurs de mort cellulaire sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T. Nous devons encore étudier l'expression ainsi que la distribution des autres récepteurs de mort cellulaire et de leur ligand dans notre modèle de tumeur induite.

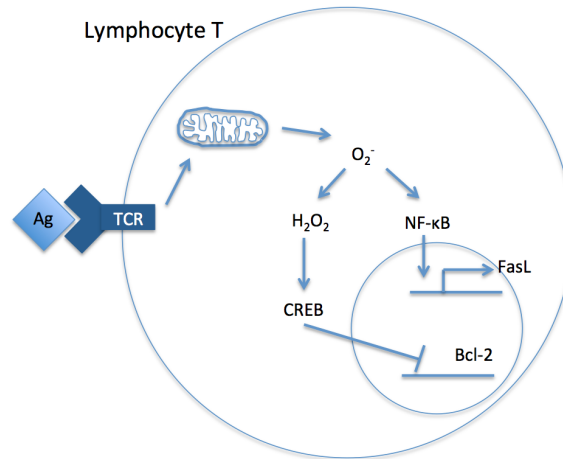
Sensibilisation des lymphocytes T à l'apoptose

Le Professeur Van Ginderachter et son équipe ont montré en 2013 que les MO-MDSCs pouvaient sensibiliser les lymphocytes T à l'apoptose cellulaire médiée par Fas [557]. *In vitro*, ils ont montré que la co-culture de lymphocytes T et des MO-MDSCs, induisait l'augmentation de l'expression de Fas sur les lymphocytes T. Cette augmentation est induite par le NO produit par les MO-MDSCs en présence d' IFN γ . En effet, lorsqu'ils co-cultivent des T avec des MO-MDSC provenant de souris déficientes pour le récepteur à l' IFN γ ou pour iNOS ils n'observent pas d'augmentation de l'expression de Fas. Ils concluent que le NO produit par les MO-MDSCs favorise l'expression de Fas sur les lymphocytes T [557]. Dans notre modèle de tumeur inductible, nous avons montré que la déplétion de la population de MO-MDSCs par un traitement avec le 5-FU ne permettait pas de diminuer l'entrée en apoptose des lymphocytes T recrutés au niveau de la tumeur.

Les ROS peuvent également influencer la sensibilité des lymphocytes T à l'apoptose. Il est décrit qu'à la suite de l'activation des lymphocytes T, on observe une augmentation de la concentration intra-cellulaire de ROS [578]. Ces ROS favorisent l'expression de FasL à la surface des lymphocytes T et peuvent également induire une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [579]. De plus les ROS peuvent induire la dimérisation des protéines BAX favorisant la formation de pores au niveau de la mitochondrie [216] (Figure 31).

Figure 31 : **Représentation schématique des voies de signalisation qui contrôlent l'expression de FasL et de Bcl-2.**

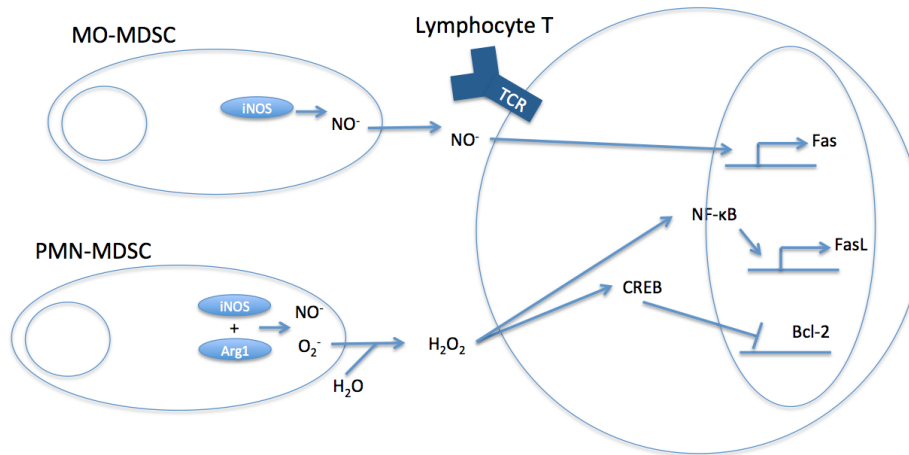
Inspiré de Hildeman [578]



Cependant, il a été montré par Bronte que les ROS produits par les PMN-MDSCs pouvaient également influencer l'expression de Bcl-2 dans les lymphocytes T [186]. En effet, il a été montré que l'ajout de H_2O_2 dans l'environnement de lymphocytes T non stimulés induisait une expression de FasL, démontrant que les ROS pouvaient diffuser dans les cellules lymphocytaires [580]. Bronte montre également que la concentration en ROS extracellulaires influence la quantité de molécules FasL exprimées par les lymphocytes T. Tout ceci tend à confirmer que les observations réalisées par Hildeman sur le rôle des ROS dans la sensibilisation des lymphocytes T à l'apoptose sont amplifiées par les ROS extralymphocytaires produits éventuellement par les PMN-MDSCs (Figure 32).

Figure 32 : **Représentation schématique des voies de signalisation qui contrôlent la sensibilité à l'apoptose des lymphocytes T**

Inspiré de Bronte [186] et Schouppe [555]



Comme nous l'avons indiqué, les mécanismes d'immunosuppression peuvent être nombreux et ne sont pas exclusifs. Par conséquent, nous devrions tester, chez nos souris porteuses d'un mélanome induit, la concentration en NO et en ROS afin de réaliser un profil de stress cellulaire dans l'environnement tumoral et comparer ce profil de stress cellulaire avec le profil obtenu dans des tumeurs transplantables. L'utilisation de « oxidation-sensitive dye DCFDA » ou du réactif de Greiss nous permettrait, respectivement, de déterminer la quantité de ROS et de NO dans nos échantillons [581]. Si nous détectons une différence par rapport aux tumeurs transplantables, nous pourrions utiliser différents inhibiteurs, déjà décrits pour être utilisés *in vivo*, au moment de nos transferts adoptifs et étudier leurs effets sur la fonction et l'apoptose des T TCR P1A Tg.

Les Galectines

À l'exception de la Galectine-9 [298], plusieurs études montrent une expression des Galectines-3 [281] et -1 [582] dans l'environnement tumoral. Il a été montré au sein du laboratoire, par l'équipe du docteur Nicolas van Baren, une expression de la Galectine-3 au niveau des métastases chez des patients atteints de mélanomes (résultats non publiés).

Nous avons réalisé quelques marquages en immunohistochimie contre la Galectine-3 mais le marquage était fort diffus, ce qui ne nous permettait pas de conclure sur une colocalisation entre la présence de Galectine-3 et la présence de lymphocytes T comme montré chez l'homme par l'équipe du docteur Nicolas van Baren et du docteur Pierre van der Bruggen.

Afin de connaître la production des différentes Galectines dans l'environnement tumoral, nous pourrions prélever des tumeurs induites ou transplantées et les mettre en culture durant 48h. Sur le surnageant, nous réaliserions des ELISA pour déterminer la concentration des différentes Galectines dans les deux modèles. Si nous observons des différences entre les deux types de tumeurs, nous pourrions associer notre transfert adoptif avec des inhibiteurs de Galectines, comme le GC-S100 ou d'autres inhibiteurs qui sont testés à l'heure actuelle par l'équipe du Professeur Pierre van der Bruggen.

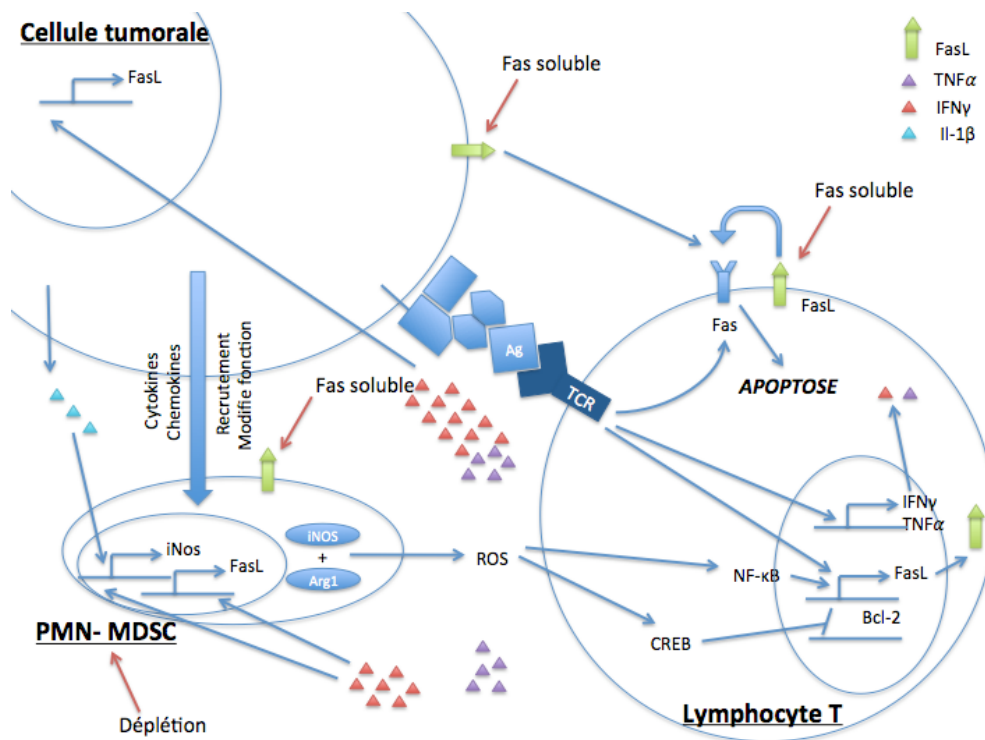
Conclusions générale de l'étude

Nous observons dans notre modèle de mélanome inductible un mécanisme d'échappement tumoral qui induit la délétion des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux. Cette délétion au niveau de l'environnement tumoral induit un appauvrissement des lymphocytes T anti-P1A dans les organes lymphoïdes secondaires conduisant à leur disparition chez les souris porteuses d'une tumeur induite.

Nous avons montré que la voie Fas/FasL était impliquée dans l'entrée en apoptose des lymphocytes T. Même si nous devons encore déterminer quelles cellules expriment FasL dans l'environnement tumoral, Jingjing Zhu, Marine Blackman et Marie Solvay développent une protéine Fas soluble qui bloquerait la voie de signalisation Fas/FasL. Nous espérons, de cette manière, inhiber l'apoptose des lymphocytes T et permettre le rejet des tumeurs. Selon les résultats obtenus, nous pourrions combiner les protocoles de vaccination anti-P1A avec cette protéine soluble une fois que les tumeurs auront été observées.

Nous supposons également l'implication d'autres mécanismes d'inhibition qui sensibiliseraient les lymphocytes T à l'apoptose. Nous voulons donc étudier l'effet de différents inhibiteurs, comme la nitroaspirine qui diminue l'expression de l'Arginase1, d'iNOS et donc la production de ROS [583] afin d'étudier leur impact sur l'apoptose des lymphocytes T (Figure 33).

Figure 33 : **Représentation schématique des mécanismes induisant l'apoptose des lymphocytes T ainsi que les différentes cibles pour les inhiber dans le modèle de mélanome inducible TiRP-10B**



Enfin, selon les résultats obtenus, nous pourrions étudier l'entrée en apoptose des lymphocytes T chez des patients atteints de mélanome. En déterminant les antigènes présents sur des mélanomes humains, nous pourrions incuber des lymphocytes T humains spécifiques des antigènes exprimés par la tumeur avec des tranches de tumeurs fraîchement prélevées et étudier la viabilité des lymphocytes T. Nous pourrions également utiliser des lymphocytes T transduits comme ceux utilisés en immunothérapie. Si nous

détections une entrée en apoptose des lymphocytes T, nous pourrions dès lors tester l'efficacité de notre protéine Fas soluble. Nous pourrions également tester sur ces co-cultures d'éventuelles molécules inhibitrices des voies de sensibilisation que nous aurions identifiées dans notre modèle.

Conclusions

Comme nous l'avons montré, il semblerait que la délétion des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux soit une des possibilités qui expliquerait l'absence d'effet de l'immunothérapie chez l'homme.

Cependant, les cellules tumorales ont développé de multiples mécanismes pour échapper au système immunitaire. De nombreux agents anticancéreux plus efficaces et plus ciblés sont développés à l'heure actuelle montrant des résultats prometteurs. De plus, de nombreuses études cliniques débutent à l'heure actuelle visant à contrôler les molécules suppressives présentes dans l'environnement tumoral. L'équipe d'Andersen [584] a montré chez des patients atteints d'un cancer du poumon à petites cellules l'existence de CTLs qui reconnaissent différents peptides codé par l'IDO. La vaccination de ces patients contre un des peptides permet le développement non seulement de CTL anti-IDO producteur d'IFN γ mais également une augmentation de la survie des patients dans 47% des cas [585]. Une étude similaire chez des patients porteurs de mélanome est en cours de réalisation (NCT01543464).

Enfin, la découverte de nouveaux mécanismes d'immunosuppression ouvre une série de possibilités qui permettraient, dans un futur proche, d'obtenir de nouvelles cibles permettant de favoriser le rejet tumoral. Dernièrement, il a été montré par l'équipe de Douglas Fearon que l'expression de la protéine d'activation des fibroblastes (FAP), pourrait également être impliquée dans les mécanismes d'échappement tumoral. Dans ce modèle d'adénocarcinome pancréatique, il a été montré les fibroblastes FAP $^{+}$ associés au carcinome induiraient l'absence de recrutement de lymphocytes T dans l'environnement

tumoral en raison de l'expression de la chemokine CXCL12. En effet, l'inhibition de cette chemokine induit une augmentation du recrutement des lymphocytes T et un rejet des tumeurs si cette inhibition est combinée avec un anticorps anti-PD1 [586].

Matériels et Méthodes

Mice

TiRP-10B;InK4a/ARF^{flox/flox} mice (TiRP-10B^{+/+}) have previously been described on a B10.D2 background [531, 546]. Negative TiRP-10B;InK4a/ARF^{flox/flox} mice (TiRP-10B^{-/-}) were selected by cross two TiRP-10B;InK4a/ARF^{flox/flox} who genotype negative for TiRP's transgene. Genotyping for the presence of TiRP-10B transgene was performed by PCR on tail DNA with primer Ivo021 (5'-AACTGCAGTGGGCAGGTAAGTATCAAGG-3') and CreEr1as (5'-CGCATAACCAGTGAAACAGC-3') that amplified a 586 bp fragment. Mice heterozygous for the H-2L^d/P1A₃₅₋₄₃-specific transgene, T TCR P1A Tg mice, were kept on B10.D2.Rag1 KO background [533]. Mice were used between 6-10 weeks old. DBA/2 female mice were derived from an inbred colony. All mice used in this study were produced under SPF conditions in the LICR animal facility. Handling of mice and experimental procedures were conducted in accordance with national and institutional guidelines for animal care.

Viruses

The coding sequence for the first 81 residues of the Invariant chain (Ii) and the coding sequence for the first 83 residues of P1A antigen were fused and placed under the control of an SV40 promoter. Defective adenoviral vectors [587] were cloned with the construct and amplified. After purification, Adeno.Ii.P1At viruses were immediately frozen at -80°C. Recombinant SFV encoding the entire P1A gene was obtained from Peter Liljestrom laboratory [588, 589].

Immunization

TiRP-10B^{+/+} or TiRP-10B^{-/-} mice were immunized against P1A by an heterologous prime-boost regimen 2 weeks apart: Adeno.Ii.P1At (10^8 plaque-forming units (pfu)) and SFV.P1A (10^7 international units (IU)) were given intradermally (i.d) in 100 µl of PBS divided between both ears. For anti-P91A immunization, mice received 4 i.m injections [542], weeks apart of P91A peptide (50µg) in PBS mixed v/v with AS15 (GSK) adjuvant. DBA/2 spleen cells (1×10^6) were injected i.p in 200 µl PBS after RBC lysis (RBC lysis buffer; Life technologies).

4OH-Tamoxifen injections

Fresh solution of 4OH-Tamoxifen were prepared by diluting 4OH-Tamoxifen (H6278; Sigma Aldrich) in ethanol and sunflower oil (1:9 ratio) followed by 30 min sonication in an ultrasonicator. For tumor induction, TiRP-10B^{+/+} mice were anesthetized and received two s.c injections of 200 µl 4OH-Tamoxifen solution (20 mg/ml) into the neck area, two weeks apart.

Cell lines and injections

T429.11 subclone was derived from the P1A-expressing T429 amelanotic tumor described previously [546]. Cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10 % of fetal bovine serum (FBS). For transplantation experiments, 2×10^6 T429.11 cells suspended in PBS were injected s.c into the right flank of TiRP-10B^{-/-} mice. L1210.P1A.B7-1 cells, expressing the P1A tumor antigen and the co-stimulatory molecule B7-1 [587] were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FCS. Cells were incubated at 37°C in an 8% CO₂ atmosphere.

Tissue preparation

Spleens, skin draining lymph nodes and tumors were collected and single-cell suspensions were prepared by mechanical disruption with the plunger of a 5-ml syringe then filtered through a 40µM nylon cell stainer (BD Falcon). Cells were resuspended in Iscove Dulbecco's medium supplemented with 0.24 mM Asparagine, 1.5 mM Glutamine, 0.5 mM Arginine, 50 µM 2-ME (Iscove complete medium) and 10% FCS

In vitro stimulation for FACS analysis

3×10^6 spleen cells from immunized tumor-bearing or tumor-free mice were stimulated in vitro during one week with 3×10^6 irradiated (3 000 rad) TiRP-10^{-/-} splenocytes pulsed with P1A or P91A (10 µM) peptide in 24-well plates, in 2 ml Iscove complete medium + 10 % FCS. Cells were incubated at 37°C in a 8% CO₂ atmosphere. Cells were collected and resuspended in Hank's medium (HCF) supplemented with 2% FBS for flow cytometry.

Ex vivo stimulation for FACS analysis

Dissociated tumor tissues, splenocytes, and skin draining lymph node were stimulated during 5 hours with 1×10^5 L1210.P1A.B7-1 cells in the presence of Brefeldin A ($10 \mu\text{g/ml}$; B7651; Sigma Aldrich) at 37°C in a 8% CO_2 atmosphere. Cells were collected and resuspended in HCF supplemented with 2% FBS for flow cytometry.

Antibodies and tetramer for FACS analysis

Single cell suspensions resuspended in $100 \mu\text{l}$ of HCF + 2% FCS. For tetramer staining, cells were incubated for 15 min at room temperature in the dark in HCF buffer containing 10 nM PE-labeled H-2L^d/P1A tetramer [545] or 10 nM PE-labeled H-2L^d/P91A tetramer. PerCP-CD8 α (clone 53-6.7; BioLegend; 1/200) and APC-CD69 (clone H1.2F3; BioLegend; 1/200) were added for an additional 15 min. Cells were washed twice and Annexin V binding assay was performed using APC-Annexin V (640920; Biolegend) according to the manufacturer's recommendation. For intracellular cytokine staining, cells were fixed and permeabilized with the Cytofix/Cytoperm Kit (51-2090KZBD; Affymetrix) and were stained with APC-anti-IFN γ (XMG1.2; 1/200). All stainings were performed after Fc receptor blockade with 2.4G2 mAb ($5 \mu\text{g/ml}$) for 15 min. Samples were acquired on a LSR Fortessa (BD Bioscience) and analysed by FlowJo.

In vivo CTL assays

DBA/2 splenocytes were stained with $10 \mu\text{M}$ CFSE (c34554; Life Technologies) (CFSE^{high}) and TiRP-10B^{-/-} with $1 \mu\text{M}$ (CFSE^{low}) for 10 min at 37°C in the dark. For anti-P1A CTL

activity analysis, TiRP-10B^{-/-} spleen cells, CFSE^{high}, were pulsed with peptide P1A₃₅₋₄₃ (LPYLGWLVF); CFSE^{low} spleen cells were pulsed with the irrelevant P91A₁₂₋₂₆ peptide (QNHRA_{LDLVA} [549]) ; for 10 min at 37°C in the dark. For both experiments 10⁷ splenocytes of each population were transferred i.v. Host's spleens were harvested 18h later and CFSE-labeled cells were analysed by flow cytometry. Percent lysis was calculated as follows: $100 \times (1 - (\% \text{ of CFSE}^{\text{high}}_{\text{target}} / \% \text{ of CFSE}^{\text{low}}_{\text{target}}) / (\% \text{ of CFSE}^{\text{high}}_{\text{control}} / \% \text{ of CFSE}^{\text{low}}_{\text{control}}))$.

Adoptive transfer experiments

CD8⁺ T cells were isolated from spleens and lymph node of TCR P1A Tg mice with anti-CD8 α microbeads (130-049-401; Miltenyi Biotec) through LS columns (130-042-401; Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's protocol. Naïve P1ATCR CD8⁺ T cells (1 x 10⁴) were stimulated with 1 x 10⁴ L1210.P1A.B7-1 irradiated cells (10 000 rad). On day 4, activated P1ATCR CD8⁺ T cells were collected and 10 x 10⁶ cells resuspended in 200 μ l PBS were injected i.v through the retroorbital sinus. 4 or 22 days later, mice were sacrificed for analysis.

Fas siRNA inhibition (Jing Jing Zhu protocol)

Silencing of Fas in activated P1ATCR CD8⁺ T cells was performed by using Accell siRNA (Dharmacon). The Fas siRNA sequence is 5'(P)-GUGCAAGUGCAAACCAGAC(dTdT)-3'. Accell siRNA was used at 1 μ M and experiments were performed according to the instructions of the manufacturer. One day after activation, 2x10⁵ activated P1ATCR CD8⁺ T cells were co-incubated with 1 μ M Accell Fas siRNA in Iscove complete medium. Cells were then

incubated at 37 C° for 24 hours and changed back to the normal Iscove complete medium with 10 % FCS. On day 3 after T cell activation, the same silencing procedure were repeated and 5x10⁵ P1ATCR CD8⁺ T cells were co-incubated with 1 µM Accell Fas siRNA in Iscove complete medium. On day four, 10x10⁶ of the Fas-silenced TCRP1A CD8⁺ T cells were injected i.v into mice bearing induced tumors.

PCR and quantitative analysis

Tumor and spleen samples were collected and frozen in liquid nitrogen. Cryosections were performed and NucleoSpin RNA isolation kit (Macherey-Nagel) was used to extract total RNA. NucleoSpin RNA/DNA Buffer Set (740944; Macherey Nagel) was used to extract total DNA from the same samples. 2 µg RNA were engaged in reverse transcription with RevertAid RT kit (K1691; Thermo Scientific). Quantitative PCR reactions were performed using primers and probes specific for murine IFN γ and β -actin with qPCR Mastermix for Taqman (RT-QP73-05; Eurogentec). The sequences of the primers were as follows: mIFN γ , 5'- TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' (forward) and 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3' (reverse); m β -actin, 5'-CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAG-3' (forward) and 5'-GCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3' (reverse). The sequences of specific probes were as follows: mIFN γ , 5'- TCACCATCCTTTTGCCAGTTCCTCCAG-3'; m β -actin, 5'-ATCGGTGGCTCCATCCTGGC-3'.* cDNA was amplified as follows : 35 cycles of a two-step PCR program at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Reactions were run and analysed on a AB Applied Biosystems Step one (AB Applied). Semiquantitative clonotypic PCR for P1A Tg TCR and β -actin were performed with the TaKaRa mix for PCR. The sequence of the primers for the P1A Tg TCR chain α were 5'-GAATTCATGCGTCCTGGCACCTGC-3' (forward) and 5'-

ACCAGCAATCGAGTCCCACTTCA-3' (reverse). DNA was amplified as follows: 25 cycles (β -actin) or 40 cycles (P1A Tg TCR chain α) of a three step PCR program at 95°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 2 min.

Histological analysis and immunohistochemistry

Seven μ m-thick cryosections were obtained from frozen OCT-embedded tissue samples, air dried, stored at -80°C until use, then thawed and fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min. Sections were incubated for 30 min with PBS + 3% BSA + 1,5% Milk, washed, and incubated during 3 hours with rat anti-mouse TCR V α 8.3 (125701; Biolegend; 1/50) and rabbit anti-mouse cleaved Caspase-3 (9664; Cell Signalling; 1/200) in antibody diluent (Dako Real Antibody diluent; S202230; Dako). The slides were washed and incubated for 1 h with a secondary polyclonal anti-rat Alexa Fluor 488 (Life technologies; 1/200), a polyclonal anti-rabbit Alexa Fluor 567 (Life Technologies; 1/200), and 4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI)(D1306; Life Technologies; 1/2000). All reactions were carried out at room temperature. Stained slides were digitized by automated whole-slide image capture, using a Mirax Midi scanner (Carl Zeiss MicroImaging), equipped with a Zeiss Plan-Apochromat 20 $\times$ NA 0.80 objective lens and a Hitachi HV-F22 acquisition camera, providing an object pixel size of 0.23 μ m. Image acquisition was controlled with the Mirax Scan software (Zeiss). Image files were compressed with 0.80 $\times$ jpeg, and analysed with the Mirax Viewer software (Zeiss).

Statistical analyses

All results are expressed as means $\pm$ s.e.m. Data were analysed with unpaired two-tailed t-tests (Mann Whitney) using GraphPad, and two-tails P values are given as follows: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; and ***, $P < 0,0005$, n.s not significant. All experiments were repeated at least once with comparable results. Times for tumor appearance were plotted according to the Kaplan Meier method and were compared with Logrank test.

Bibliographie

1. Garbe, C. and U. Leiter, *Melanoma epidemiology and trends*. Clin Dermatol, 2009. **27**(1): p. 3-9.
2. Gogas, H., A. Polyzos, and J. Kirkwood, *Immunotherapy for advanced melanoma: fulfilling the promise*. Cancer Treat Rev, 2013. **39**(8): p. 879-85.
3. Soong, S.J., et al., *Factors affecting survival following local, regional, or distant recurrence from localized melanoma*. J Surg Oncol, 1998. **67**(4): p. 228-33.
4. Tas, F., *Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors*. J Oncol, 2012. **2012**: p. 647684.
5. Huncharek, M., J.F. Caubet, and R. McGarry, *Single-agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials*. Melanoma Res, 2001. **11**(1): p. 75-81.
6. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
7. Brose, M.S., et al., *BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 6997-7000.
8. Bollag, G., et al., *Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma*. Nature, 2010. **467**(7315): p. 596-9.
9. Tsai, J., et al., *Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3041-6.
10. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
11. Beadling, C., et al., *KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6821-8.
12. Guo, J., et al., *Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification*. J Clin Oncol, 2011. **29**(21): p. 2904-9.

13. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
14. Boon, T., et al., *Human T cell responses against melanoma*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 175-208.
15. Corbiere, V., et al., *Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases*. Cancer Res, 2011. **71**(4): p. 1253-62.
16. Vigneron, N., et al., *Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update*. Cancer Immun, 2013. **13**: p. 15.
17. Stroobant, V., et al., *Inefficient exogenous loading of a tapasin-dependent peptide onto HLA-B*44:02 can be improved by acid treatment or fixation of target cells*. Eur J Immunol, 2012. **42**(6): p. 1417-28.
18. Goodyear, O.C., et al., *Dominant responses with conservation of T-cell receptor usage in the CD8+ T-cell recognition of a cancer testis antigen peptide presented through HLA-Cw7 in patients with multiple myeloma*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(12): p. 1751-61.
19. Anderson, L.D., Jr., et al., *Identification of MAGE-C1 (CT-7) epitopes for T-cell therapy of multiple myeloma*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(7): p. 985-97.
20. Ma, W., et al., *A MAGE-C2 antigenic peptide processed by the immunoproteasome is recognized by cytolytic T cells isolated from a melanoma patient after successful immunotherapy*. Int J Cancer, 2011. **129**(10): p. 2427-34.
21. Wen, W., et al., *Identification of promiscuous HLA-DR-restricted CD4(+) T-cell epitopes on the cancer-testis antigen HCA587*. Cancer Sci, 2011. **102**(8): p. 1455-61.
22. Ochsenreither, S., et al., *Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen*. Blood, 2012. **119**(23): p. 5492-501.
23. Tomita, Y., et al., *A novel tumor-associated antigen, cell division cycle 45-like can induce cytotoxic T-lymphocytes reactive to tumor cells*. Cancer Sci, 2011. **102**(4): p. 697-705.
24. Nakatsugawa, M., et al., *Identification of an HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from the lung carcinoma antigen, Lengsin*. Int J Oncol, 2011. **39**(4): p. 1041-9.
25. Widenmeyer, M., et al., *Promiscuous survivin peptide induces robust CD4+ T-cell responses in the majority of vaccinated cancer patients*. Int J Cancer, 2012. **131**(1): p. 140-9.
26. Yamazoe, S., et al., *Identification of HLA-A*0201- and A*2402-restricted epitopes of mucin 5AC expressed in advanced pancreatic cancer*. Pancreas, 2011. **40**(6): p. 896-904.
27. Meng, Z., et al., *Identification of an HLA-DPB1*0501 restricted Melan-A/MART-1 epitope recognized by CD4+ T lymphocytes: prevalence for immunotherapy in Asian populations*. J Immunother, 2011. **34**(7): p. 525-34.
28. Osen, W., et al., *Screening of human tumor antigens for CD4 T cell epitopes by combination of HLA-transgenic mice, recombinant adenovirus and antigen peptide libraries*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14137.
29. Dalet, A., et al., *An antigenic peptide produced by reverse splicing and double asparagine deamidation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. E323-31.

30. Tarhini, A.A., et al., *Safety and immunogenicity of vaccination with MART-1 (26-35, 27L), gp100 (209-217, 210M), and tyrosinase (368-376, 370D) in adjuvant with PF-3512676 and GM-CSF in metastatic melanoma*. J Immunother, 2012. **35**(4): p. 359-66.
31. Nakai, N., et al., *Dendritic cell vaccination in human melanoma: relationships between clinical effects and vaccine parameters*. Pigment Cell Melanoma Res, 2010. **23**(5): p. 607-19.
32. Odunsi, K., et al., *Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(15): p. 5797-802.
33. Garulli, B., et al., *Immunogenicity of a recombinant influenza virus bearing both the CD4+ and CD8+ T cell epitopes of ovalbumin*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 497364.
34. Naslund, T.I., et al., *Comparative prime-boost vaccinations using Semliki Forest virus, adenovirus, and ALVAC vectors demonstrate differences in the generation of a protective central memory CTL response against the P815 tumor*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6761-9.
35. Kalariya, M., S. Ganta, and M. Amiji, *Multi-compartmental vaccine delivery system for enhanced immune response to gp100 peptide antigen in melanoma immunotherapy*. Pharm Res, 2012. **29**(12): p. 3393-403.
36. Tan, C., et al., *Impact of anti-CD25 monoclonal antibody on dendritic cell-tumor fusion vaccine efficacy in a murine melanoma model*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 148.
37. Phan, G.Q. and S.A. Rosenberg, *Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy*. Cancer Control, 2013. **20**(4): p. 289-97.
38. Rosenberg, S.A., et al., *Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 6169-76.
39. Rosenberg, S.A., J.C. Yang, and N.P. Restifo, *Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 909-15.
40. Jochems, C. and J. Schlom, *Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(5): p. 567-79.
41. Lurquin, C., et al., *Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 249-57.
42. Peterson, A.C., H. Harlin, and T.F. Gajewski, *Immunization with Melan-A peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin-12 induces clinical activity and T-cell responses in advanced melanoma*. J Clin Oncol, 2003. **21**(12): p. 2342-8.
43. Harlin, H., et al., *Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(10): p. 1185-97.
44. Bernatchez, C., L.G. Radvanyi, and P. Hwu, *Advances in the treatment of metastatic melanoma: adoptive T-cell therapy*. Semin Oncol, 2012. **39**(2): p. 215-26.
45. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 269-81.

46. Johnson, L.A., et al., *Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen*. Blood, 2009. **114**(3): p. 535-46.
47. Duong, C.P., et al., *Cancer immunotherapy utilizing gene-modified T cells: From the bench to the clinic*. Mol Immunol, 2015.
48. Kline, J., et al., *Cellular and molecular requirements for rejection of B16 melanoma in the setting of regulatory T cell depletion and homeostatic proliferation*. J Immunol, 2012. **188**(6): p. 2630-42.
49. Kodumudi, K.N., et al., *Blockade of myeloid-derived suppressor cells after induction of lymphopenia improves adoptive T cell therapy in a murine model of melanoma*. J Immunol, 2012. **189**(11): p. 5147-54.
50. Zou, W. and L. Chen, *Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 467-77.
51. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
52. Suttmoller, R.P., et al., *Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 823-32.
53. Shin, D.S. and A. Ribas, *The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next?* Curr Opin Immunol, 2015. **33C**: p. 23-35.
54. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
55. Schietinger, A. and P.D. Greenberg, *Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction*. Trends Immunol, 2014. **35**(2): p. 51-60.
56. Schwartz, R.H., *Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?* J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 1-8.
57. Jenkins, M.K. and R.H. Schwartz, *Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo*. J Exp Med, 1987. **165**(2): p. 302-19.
58. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
59. Taams, L.S., W. van Eden, and M.H. Wauben, *Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1543-50.
60. Krummel, M.F. and J.P. Allison, *CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2533-40.
61. Becker, J.C., et al., *Negative transcriptional regulation in anergic T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(6): p. 2375-8.
62. Jenkins, M.K., et al., *Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody*. J Immunol, 1990. **144**(1): p. 16-22.

63. Carlin, L.M., et al., *Secretion of IFN-gamma and not IL-2 by anergic human T cells correlates with assembly of an immature immune synapse*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3874-9.
64. Tham, E.L., P. Shrikant, and M.F. Mescher, *Activation-induced nonresponsiveness: a Th-dependent regulatory checkpoint in the CTL response*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1190-7.
65. Otten, G.R. and R.N. Germain, *Split anergy in a CD8+ T cell: receptor-dependent cytotoxicity in the absence of interleukin-2 production*. Science, 1991. **251**(4998): p. 1228-31.
66. Beverly, B., et al., *Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation*. Int Immunol, 1992. **4**(6): p. 661-71.
67. Ramsdell, F. and B.J. Fowlkes, *Maintenance of in vivo tolerance by persistence of antigen*. Science, 1992. **257**(5073): p. 1130-4.
68. Rocha, B., C. Tanchot, and H. Von Boehmer, *Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen*. J Exp Med, 1993. **177**(5): p. 1517-21.
69. Redmond, W.L. and L.A. Sherman, *Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 275-84.
70. Bronstein-Sitton, N., et al., *Sustained exposure to bacterial antigen induces interferon-gamma-dependent T cell receptor zeta down-regulation and impaired T cell function*. Nat Immunol, 2003. **4**(10): p. 957-64.
71. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
72. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends Immunol, 2002. **23**(9): p. 445-9.
73. Markmann, J., et al., *Antigen presenting function of class II MHC expressing pancreatic beta cells*. Nature, 1988. **336**(6198): p. 476-9.
74. Malvey, E.N., M.K. Jenkins, and D.L. Mueller, *Peripheral immune tolerance blocks clonal expansion but fails to prevent the differentiation of Th1 cells*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2168-77.
75. Tanchot, C., et al., *Adaptive tolerance of CD4+ T cells in vivo: multiple thresholds in response to a constant level of antigen presentation*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2030-9.
76. Schietinger, A., et al., *Rescued tolerant CD8 T cells are preprogrammed to reestablish the tolerant state*. Science, 2012. **335**(6069): p. 723-7.
77. Thierfelder, W.E., et al., *Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 171-4.
78. Curtsinger, J.M., et al., *Signal 3 tolerant CD8 T cells degranulate in response to antigen but lack granzyme B to mediate cytotoxicity*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4392-9.
79. Gallimore, A., et al., *Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1383-93.
80. Giley, J.P., et al., *T cell exhaustion in protozoan disease*. Trends Parasitol, 2012. **28**(9): p. 377-84.
81. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.

82. Blackburn, S.D., et al., *Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 29-37.
83. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
84. Urbani, S., et al., *Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses*. Hepatology, 2006. **44**(1): p. 126-39.
85. West, E.E., et al., *PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells*. J Clin Invest, 2013. **123**(6): p. 2604-15.
86. Jin, H.T., et al., *Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14733-8.
87. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 305-34.
88. Baitsch, L., et al., *Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2350-60.
89. Zippelius, A., et al., *Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance*. Cancer Res, 2004. **64**(8): p. 2865-73.
90. Rabinovich, G.A., D. Gabrilovich, and E.M. Sotomayor, *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 267-96.
91. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
92. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 387-96.
93. Abbas, A.K., et al., *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 307-8.
94. Hori, S., T. Takahashi, and S. Sakaguchi, *Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells*. Adv Immunol, 2003. **81**: p. 331-71.
95. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
96. McHugh, R.S., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 311-23.
97. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 503-13.
98. Perkins, D., et al., *Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation*. J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4154-9.
99. Fazekas de St Groth, B., A.L. Smith, and C.A. Higgins, *T cell activation: in vivo veritas*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(3): p. 260-8.
100. Grosso, J.F., et al., *LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3383-92.
101. Esparza, E.M. and R.H. Arch, *Glucocorticoid-induced TNF receptor, a costimulatory receptor on naive and activated T cells, uses TNF receptor-associated factor 2 in a novel fashion as an inhibitor of NF-kappa B activation*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7875-82.

102. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
103. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 183-90.
104. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
105. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
106. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
107. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
108. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
109. Pontoux, C., A. Banz, and M. Papiernik, *Natural CD4 CD25(+) regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10*. Int Immunol, 2002. **14**(2): p. 233-9.
110. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
111. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
112. Campbell, D.J. and M.A. Koch, *Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 119-30.
113. Ray, A., et al., *Regulatory T cells in many flavors control asthma*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(3): p. 216-29.
114. Yadav, M., et al., *Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1713-22, S1-19.
115. Gregori, S., K.S. Goudy, and M.G. Roncarolo, *The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 30.
116. Bilate, A.M. and J.J. Lafaille, *Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 733-58.
117. Lin, X., et al., *Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(2): p. 116-23.
118. Weiss, J.M., et al., *Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1723-42, S1.
119. Groux, H., et al., *Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 19-29.
120. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.

121. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4772-80.
122. Mahnke, K., et al., *Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4862-9.
123. Groux, H., *Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses*. Transplantation, 2003. **75**(9 Suppl): p. 8S-12S.
124. Groux, H. and F. Cottrez, *The complex role of interleukin-10 in autoimmunity*. J Autoimmun, 2003. **20**(4): p. 281-5.
125. Inobe, J., et al., *IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis*. Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2780-90.
126. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 207-14.
127. Zhang, H., et al., *Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 125.
128. Vocanson, M., et al., *Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(2): p. 280-9, 289 e1-7.
129. Miller, A., et al., *Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 421-5.
130. Endharti, A.T., et al., *Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8⁺ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7093-7.
131. Wang, H.Y., et al., *Tumor-specific human CD4⁺ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy*. Immunity, 2004. **20**(1): p. 107-18.
132. Vence, L., et al., *Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20884-9.
133. Francois, V., et al., *The CD4(+) T-cell response of melanoma patients to a MAGE-A3 peptide vaccine involves potential regulatory T cells*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4335-45.
134. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
135. Ahmadzadeh, M. and S.A. Rosenberg, *TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5215-23.
136. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 635-46.
137. Sim, G.C., et al., *IL-2 therapy promotes suppressive ICOS⁺ Treg expansion in melanoma patients*. J Clin Invest, 2014. **124**(1): p. 99-110.
138. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 1209-20.

139. Akbari, O., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu, *Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 725-31.
140. Kruger-Krasagakes, S., et al., *Expression of interleukin 10 in human melanoma*. Br J Cancer, 1994. **70**(6): p. 1182-5.
141. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.
142. Willems, F., et al., *Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes*. Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 1007-9.
143. D'Andrea, A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1041-8.
144. Yue, F.Y., et al., *Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules*. Int J Cancer, 1997. **71**(4): p. 630-7.
145. Kurte, M., et al., *A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1731-7.
146. Levings, M.K., et al., *IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5530-9.
147. Hasegawa, M., et al., *Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis*. J Rheumatol, 1997. **24**(2): p. 328-32.
148. Dummer, W., et al., *Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma*. Melanoma Res, 1995. **5**(1): p. 67-8.
149. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 770-4.
150. Kehrl, J.H., et al., *Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth*. J Exp Med, 1986. **163**(5): p. 1037-50.
151. Kehrl, J.H., et al., *Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes*. J Immunol, 1986. **137**(12): p. 3855-60.
152. Grotendorst, G.R., G. Smale, and D. Pancev, *Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils*. J Cell Physiol, 1989. **140**(2): p. 396-402.
153. Javelaud, D., V.I. Alexaki, and A. Mauviel, *Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma*. Pigment Cell Melanoma Res, 2008. **21**(2): p. 123-32.
154. Blobe, G.C., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, *Role of transforming growth factor beta in human disease*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1350-8.
155. McKarns, S.C., R.H. Schwartz, and N.E. Kaminski, *Smad3 is essential for TGF-beta 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4275-84.
156. Thomas, D.A. and J. Massague, *TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance*. Cancer Cell, 2005. **8**(5): p. 369-80.

157. Li, M.O. and R.A. Flavell, *TGF-beta: a master of all T cell trades*. Cell, 2008. **134**(3): p. 392-404.
158. Laouar, Y., et al., *Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 600-7.
159. Rook, A.H., et al., *Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness*. J Immunol, 1986. **136**(10): p. 3916-20.
160. Flavell, R.A., et al., *The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(8): p. 554-67.
161. Weber, F., et al., *Transforming growth factor-beta1 immobilises dendritic cells within skin tumours and facilitates tumour escape from the immune system*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(9): p. 898-906.
162. Ito, M., et al., *Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node*. J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5637-43.
163. Wang, Y., et al., *The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis*. Curr Cancer Drug Targets, 2013. **13**(9): p. 963-72.
164. Cho, K.H., et al., *STAT3 mediates TGF-beta1-induced TWIST1 expression and prostate cancer invasion*. Cancer Lett, 2013. **336**(1): p. 167-73.
165. Naber, H.P., et al., *Snail and Slug, key regulators of TGF-beta-induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **435**(1): p. 58-63.
166. Krstic, J. and J.F. Santibanez, *Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 521754.
167. Fowlkes, J.L., et al., *Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases*. Prog Growth Factor Res, 1995. **6**(2-4): p. 255-63.
168. Lee, S., et al., *Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors*. J Cell Biol, 2005. **169**(4): p. 681-91.
169. Lin, C.Y., et al., *Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Sci, 2011. **102**(4): p. 815-27.
170. Bronte, V., et al., *Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5313-20.
171. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 323-31.
172. Almand, B., et al., *Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 678-89.
173. Obregon-Henao, A., et al., *Gr1(int)CD11b+ myeloid-derived suppressor cells in Mycobacterium tuberculosis infection*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80669.
174. Goni, O., P. Alcaide, and M. Fresno, *Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells*. Int Immunol, 2002. **14**(10): p. 1125-34.

175. Voisin, M.B., et al., *Both expansion of regulatory GR1⁺ CD11b⁺ myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis.* Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5487-92.
176. Makarenkova, V.P., et al., *CD11b⁺/Gr-1⁺ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress.* J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2085-94.
177. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species.* J Leukoc Biol, 2003. **74**(2): p. 186-96.
178. Gabrilovich, D.I., et al., *The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells.* Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 425; author reply 426.
179. Song, X., et al., *CD11b⁺/Gr-1⁺ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells.* J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8200-8.
180. Sinha, P., et al., *Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells.* Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 4507-13.
181. Serafini, P., et al., *High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells.* Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6337-43.
182. Shojaei, F., et al., *Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b⁺Gr1⁺ myeloid cells.* Nat Biotechnol, 2007. **25**(8): p. 911-20.
183. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
184. Gallina, G., et al., *Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8⁺ T cells.* J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2777-90.
185. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice.* J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
186. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 641-54.
187. Nagaraj, S., et al., *Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8⁺ T cell tolerance in cancer.* Nat Med, 2007. **13**(7): p. 828-35.
188. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses.* Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5839-49.
189. Mazzoni, A., et al., *Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism.* J Immunol, 2002. **168**(2): p. 689-95.
190. Cemerski, S., et al., *Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways.* J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19585-93.
191. Centuori, S.M., et al., *Myeloid-derived suppressor cells from tumor-bearing mice impair TGF-beta-induced differentiation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs from CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ T cells.* J Leukoc Biol, 2012. **92**(5): p. 987-97.
192. Huang, B., et al., *Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host.* Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1123-31.
193. Yang, L., et al., *Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis.* Cancer Cell, 2004. **6**(4): p. 409-21.
194. Wu, G., et al., *Proline metabolism in the conceptus: implications for fetal growth and development.* Amino Acids, 2008. **35**(4): p. 691-702.

195. Wu, G., et al., *Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease*. Amino Acids, 2009. **37**(1): p. 153-68.
196. Li, P., et al., *Amino acids and immune function*. Br J Nutr, 2007. **98**(2): p. 237-52.
197. Wu, G., *Amino acids: metabolism, functions, and nutrition*. Amino Acids, 2009. **37**(1): p. 1-17.
198. Wu, G. and S.M. Morris, Jr., *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. Biochem J, 1998. **336** (Pt 1): p. 1-17.
199. Walker, V., *Ammonia toxicity and its prevention in inherited defects of the urea cycle*. Diabetes Obes Metab, 2009. **11**(9): p. 823-35.
200. Rodriguez, P.C., et al., *L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes*. J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1232-9.
201. Kim, J.W., et al., *Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor*. Nature, 1991. **352**(6337): p. 725-8.
202. Rodriguez, P.C., D.G. Quiceno, and A.C. Ochoa, *L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1568-73.
203. Boutard, V., et al., *Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity*. J Immunol, 1995. **155**(4): p. 2077-84.
204. Jost, M.M., et al., *Divergent effects of GM-CSF and TGFbeta1 on bone marrow-derived macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis*. FASEB J, 2003. **17**(15): p. 2281-3.
205. Modolell, M., et al., *Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines*. Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 1101-4.
206. Angulo, I., et al., *Early myeloid cells are high producers of nitric oxide upon CD40 plus IFN-gamma stimulation through a mechanism dependent on endogenous TNF-alpha and IL-1alpha*. Eur J Immunol, 2000. **30**(5): p. 1263-71.
207. Denicola, A., J.M. Souza, and R. Radi, *Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3566-71.
208. Blaise, G.A., et al., *Nitric oxide, cell signaling and cell death*. Toxicology, 2005. **208**(2): p. 177-92.
209. Garban, H.J. and B. Bonavida, *Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 75-81.
210. Bronte, V., et al., *IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 270-8.
211. Xia, Y., et al., *Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22635-9.
212. Kusmartsev, S., et al., *Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 989-99.
213. Brito, C., et al., *Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3356-66.

214. Otsuji, M., et al., *Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13119-24.
215. Hildeman, D.A., et al., *Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15035-40.
216. D'Alessio, M., et al., *Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis*. FASEB J, 2005. **19**(11): p. 1504-6.
217. Le Floc'h, N., W. Otten, and E. Merlot, *Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications*. Amino Acids, 2011. **41**(5): p. 1195-205.
218. Ruddick, J.P., et al., *Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications*. Expert Rev Mol Med, 2006. **8**(20): p. 1-27.
219. Leklem, J.E., *Quantitative aspects of tryptophan metabolism in humans and other species: a review*. Am J Clin Nutr, 1971. **24**(6): p. 659-72.
220. Hayaishi, O., et al., *Studies on oxygenases; enzymatic formation of kynurenine from tryptophan*. J Biol Chem, 1957. **229**(2): p. 889-96.
221. Theate, I., et al., *Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues*. Cancer Immunol Res, 2014.
222. Munn, D.H., et al., *Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1363-72.
223. Munn, D.H., et al., *GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 633-42.
224. Mezrich, J.D., et al., *An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3190-8.
225. Fallarino, F., et al., *T cell apoptosis by tryptophan catabolism*. Cell Death Differ, 2002. **9**(10): p. 1069-77.
226. Yu, J., et al., *Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer*. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3783-97.
227. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1269-74.
228. Schmidt, S.K., et al., *Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase*. Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2755-64.
229. Suzuki, S., et al., *Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 2): p. 425-9.
230. Tatsumi, K., et al., *Induction of tryptophan 2,3-dioxygenase in the mouse endometrium during implantation*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(1): p. 166-70.
231. Pilotte, L., et al., *Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2497-502.
232. Messina, J.P. and D.A. Lawrence, *Cell cycle progression of glutathione-depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase*. J Immunol, 1989. **143**(6): p. 1974-81.
233. Arner, E.S. and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6102-9.

234. Gmunder, H., et al., *Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine.* Cell Immunol, 1990. **129**(1): p. 32-46.
235. Droge, W., et al., *Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives.* Am J Med, 1991. **91**(3C): p. 140S-144S.
236. Srivastava, M.K., et al., *Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine.* Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 68-77.
237. Baxter, A.G. and P.D. Hodgkin, *Activation rules: the two-signal theories of immune activation.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 439-46.
238. Carreno, B.M. and M. Collins, *The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 29-53.
239. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 336-47.
240. Mocellin, S., C. Benna, and P. Pilati, *Coinhibitory molecules in cancer biology and therapy.* Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(2): p. 147-61.
241. Leach, D.R., M.F. Krummel, and J.P. Allison, *Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade.* Science, 1996. **271**(5256): p. 1734-6.
242. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death.* EMBO J, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
243. Brunet, J.F., et al., *A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4.* Nature, 1987. **328**(6127): p. 267-70.
244. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4.* Science, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
245. Harper, K., et al., *CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location.* J Immunol, 1991. **147**(3): p. 1037-44.
246. Linsley, P.S. and J.A. Ledbetter, *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen.* Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 191-212.
247. Krummel, M.F. and J.P. Allison, *CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation.* J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 459-65.
248. Lee, K.M., et al., *Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4.* Science, 1998. **282**(5397): p. 2263-6.
249. Chikuma, S., J.B. Imboden, and J.A. Bluestone, *Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.* J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 129-35.
250. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo.* Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
251. Keir, M.E., et al., *Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance.* J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 883-95.
252. Nishimura, H., T. Honjo, and N. Minato, *Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice.* J Exp Med, 2000. **191**(5): p. 891-8.
253. Michie, A.M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection.* Semin Immunol, 2002. **14**(5): p. 311-23.

254. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.
255. Yokosuka, T., et al., *Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1201-17.
256. Sheppard, K.A., et al., *PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta*. FEBS Lett, 2004. **574**(1-3): p. 37-41.
257. Chikuma, S., et al., *PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6682-9.
258. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
259. Carter, L., et al., *PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 634-43.
260. Shi, L., et al., *The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies*. J Hematol Oncol, 2013. **6**(1): p. 74.
261. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
262. Fourcade, J., et al., *PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8+ T cell expansion in melanoma patients*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5240-9.
263. Fourcade, J., et al., *Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients*. J Exp Med, 2010. **207**(10): p. 2175-86.
264. Hamid, O., et al., *Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(2): p. 134-44.
265. Rabinovich, G.A. and M.A. Toscano, *Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 338-52.
266. van den Brule, F.A., et al., *Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma*. Hum Pathol, 1996. **27**(11): p. 1185-91.
267. Mathieu, V., et al., *Galectin-1 in melanoma biology and related neo-angiogenesis processes*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(9): p. 2245-54.
268. Sanjuan, X., et al., *Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression*. Gastroenterology, 1997. **113**(6): p. 1906-15.
269. Martinez-Bosch, N., et al., *Galectin-1 drives pancreatic carcinogenesis through stroma remodeling and Hedgehog signaling activation*. Cancer Res, 2014. **74**(13): p. 3512-24.
270. Perillo, N.L., et al., *Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes*. J Exp Med, 1997. **185**(10): p. 1851-8.
271. Matarrese, P., et al., *Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6969-85.
272. Stowell, S.R., et al., *Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3091-102.

273. Rubinstein, N., et al., *Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege*. Cancer Cell, 2004. **5**(3): p. 241-51.
274. Rabinovich, G.A., et al., *Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis*. J Exp Med, 1999. **190**(3): p. 385-98.
275. Brown, E.R., et al., *Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis*. Eur J Cancer, 2012. **48**(6): p. 865-74.
276. Stillman, B.N., et al., *Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 778-89.
277. Hoyer, K.K., et al., *An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 893-902.
278. Yang, R.Y., D.K. Hsu, and F.T. Liu, *Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6737-42.
279. Yu, F., et al., *Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15819-27.
280. Demotte, N., et al., *A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice*. Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7476-88.
281. Gordon-Alonso, M., N. Demotte, and P. van der Bruggen, *Sugars boost exhausted tumor-infiltrating lymphocytes by counteracting immunosuppressive activities of galectins*. Oncoimmunology, 2014. **3**: p. e28783.
282. Demotte, N., et al., *A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(7): p. 1823-33.
283. Liu, F.T. and G.A. Rabinovich, *Galectins as modulators of tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(1): p. 29-41.
284. Wang, Y.G., et al., *Galectin-3 increases the motility of mouse melanoma cells by regulating matrix metalloproteinase-1 expression*. Exp Mol Med, 2012. **44**(6): p. 387-93.
285. Comodo, A.i.N., et al., *Galectin-3 expression favors metastasis in murine melanoma*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2013. **4**: p. 8.
286. Iurisci, I., et al., *Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(4): p. 1389-93.
287. Newlaczyl, A.U. and L.G. Yu, *Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer*. Cancer Lett, 2011. **313**(2): p. 123-8.
288. Jiang, H.R., et al., *Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 1167-73.
289. Ohshima, S., et al., *Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(10): p. 2788-95.
290. Henderson, N.C., et al., *Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis*. Am J Pathol, 2008. **172**(2): p. 288-98.
291. Wada, J., et al., *Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin*. J Clin Invest, 1997. **99**(10): p. 2452-61.
292. Heusschen, R., A.W. Griffioen, and V.L. Thijssen, *Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1836**(1): p. 177-85.

293. Wang, F., et al., *Tim-3-Galectin-9 pathway involves the suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells*. Immunobiology, 2009. **214**(5): p. 342-9.
294. Kashio, Y., et al., *Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3631-6.
295. Zhu, C., et al., *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1245-52.
296. Seki, M., et al., *Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis*. Clin Immunol, 2008. **127**(1): p. 78-88.
297. Su, E.W., S. Bi, and L.P. Kane, *Galectin-9 regulates T helper cell function independently of Tim-3*. Glycobiology, 2011. **21**(10): p. 1258-65.
298. Irie, A., et al., *Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 2962-8.
299. Nobumoto, A., et al., *Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices*. Glycobiology, 2008. **18**(9): p. 735-44.
300. Seki, M., et al., *Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(12): p. 3968-76.
301. Krammer, P.H., R. Arnold, and I.N. Lavrik, *Life and death in peripheral T cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 532-42.
302. Green, D.R., N. Droin, and M. Pinkoski, *Activation-induced cell death in T cells*. Immunol Rev, 2003. **193**: p. 70-81.
303. Hutcheson, J., et al., *Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity*. Immunity, 2008. **28**(2): p. 206-17.
304. Okada, H., et al., *Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients*. Arch Virol, 2000. **145**(5): p. 905-20.
305. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
306. Callahan, M.K., P. Williamson, and R.A. Schlegel, *Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes*. Cell Death Differ, 2000. **7**(7): p. 645-53.
307. Stennicke, H.R. and G.S. Salvesen, *Properties of the caspases*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1387**(1-2): p. 17-31.
308. Brocklehurst, K. and M.P. Philpott, *Cysteine proteases: mode of action and role in epidermal differentiation*. Cell Tissue Res, 2013. **351**(2): p. 237-44.
309. Chang, D.W., et al., *Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation*. EMBO J, 2003. **22**(16): p. 4132-42.
310. Fischer, U., C. Stroh, and K. Schulze-Osthoff, *Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10*. Oncogene, 2006. **25**(1): p. 152-9.
311. Mashima, T., et al., *Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **217**(3): p. 1185-92.
312. Orth, K., et al., *The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A*. J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16443-6.
313. Casciola-Rosen, L., et al., *Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death*. J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 1957-64.

314. De Vos, M., V. Schreiber, and F. Dantzer, *The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art*. Biochem Pharmacol, 2012. **84**(2): p. 137-46.
315. Aredia, F. and A.I. Scovassi, *Poly(ADP-ribose): A signaling molecule in different paradigms of cell death*. Biochem Pharmacol, 2014.
316. Widlak, P. and W.T. Garrard, *Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G*. J Cell Biochem, 2005. **94**(6): p. 1078-87.
317. Martin, S.J., et al., *Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28753-6.
318. Chang, H.Y. and X. Yang, *Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 821-46.
319. Mahmood, Z. and Y. Shukla, *Death receptors: targets for cancer therapy*. Exp Cell Res, 2010. **316**(6): p. 887-99.
320. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, *Modularity in the TNF-receptor family*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(2): p. 74-9.
321. Itoh, N., et al., *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis*. Cell, 1991. **66**(2): p. 233-43.
322. Tartaglia, L.A., et al., *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death*. Cell, 1993. **74**(5): p. 845-53.
323. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
324. Papoff, G., et al., *Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 38241-50.
325. Chan, F.K., *The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function*. Ann Rheum Dis, 2000. **59 Suppl 1**: p. i50-3.
326. Siegel, R.M., et al., *Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2354-7.
327. Siegel, R.M., et al., *The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 469-74.
328. Boldin, M.P., et al., *A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain*. J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 7795-8.
329. C, J.C., et al., *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell, 1995. **81**(4): p. 505-12.
330. Weber, C.H. and C. Vincenz, *The death domain superfamily: a tale of two interfaces?* Trends Biochem Sci, 2001. **26**(8): p. 475-81.
331. Vincenz, C. and V.M. Dixit, *Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6578-83.
332. Eramo, A., et al., *CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(7): p. 1930-40.
333. Lee, K.H., et al., *The role of receptor internalization in CD95 signaling*. EMBO J, 2006. **25**(5): p. 1009-23.

334. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1166-73.
335. Thome, M., et al., *Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 517-21.
336. Krueger, A., et al., *Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20633-40.
337. Yeh, W.C., et al., *Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 633-42.
338. Irmeler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 190-5.
339. Budd, R.C., W.C. Yeh, and J. Tschopp, *cFLIP regulation of lymphocyte activation and development*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 196-204.
340. Strasser, A., *The role of BH3-only proteins in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 189-200.
341. Yin, X.M., Z.N. Oltvai, and S.J. Korsmeyer, *BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax*. Nature, 1994. **369**(6478): p. 321-3.
342. Chittenden, T., et al., *A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5589-96.
343. Huang, D.C., J.M. Adams, and S. Cory, *The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4*. EMBO J, 1998. **17**(4): p. 1029-39.
344. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-56.
345. Kaufmann, T., et al., *Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane*. J Cell Biol, 2003. **160**(1): p. 53-64.
346. Antonsson, B., et al., *Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2*. Science, 1997. **277**(5324): p. 370-2.
347. Kuwana, T., et al., *Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane*. Cell, 2002. **111**(3): p. 331-42.
348. Hao, Z., et al., *Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis*. Cell, 2005. **121**(4): p. 579-91.
349. Zou, H., et al., *An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11549-56.
350. Motoyama, N., et al., *Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1506-10.
351. Veis, D.J., et al., *Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair*. Cell, 1993. **75**(2): p. 229-40.
352. Gross, A., et al., *Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis*. EMBO J, 1998. **17**(14): p. 3878-85.
353. Boise, L.H., et al., *CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL*. Immunity, 1995. **3**(1): p. 87-98.

354. Deng, X., et al., *Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1578-83.
355. Huang, D.C. and A. Strasser, *BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death*. Cell, 2000. **103**(6): p. 839-42.
356. Marani, M., et al., *Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3577-89.
357. Wang, K., et al., *BID: a novel BH3 domain-only death agonist*. Genes Dev, 1996. **10**(22): p. 2859-69.
358. Zong, W.X., et al., *BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak*. Genes Dev, 2001. **15**(12): p. 1481-6.
359. Oda, E., et al., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1053-8.
360. Nakano, K. and K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 683-94.
361. Han, J., et al., *Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11318-23.
362. Chiang, C.W., et al., *Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(18): p. 6350-62.
363. Gross, A., et al., *Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1156-63.
364. Yin, X.M., et al., *Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis*. Nature, 1999. **400**(6747): p. 886-91.
365. Sandalova, E., et al., *Regulation of expression of Bcl-2 protein family member Bim by T cell receptor triggering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3011-6.
366. Bouillet, P., et al., *Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity*. Science, 1999. **286**(5445): p. 1735-8.
367. Yang, E., et al., *Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death*. Cell, 1995. **80**(2): p. 285-91.
368. Crispin, J.C., et al., *Induction of PP2A Bbeta, a regulator of IL-2 deprivation-induced T-cell apoptosis, is deficient in systemic lupus erythematosus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(30): p. 12443-8.
369. Li, W.Q., et al., *Interleukin-7 regulates Bim proapoptotic activity in peripheral T-cell survival*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(3): p. 590-600.
370. Crook, N.E., R.J. Clem, and L.K. Miller, *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2168-74.
371. Huang, Y., et al., *Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain*. Cell, 2001. **104**(5): p. 781-90.
372. Bratton, S.B., et al., *Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes*. EMBO J, 2001. **20**(5): p. 998-1009.
373. Holcik, M., H. Gibson, and R.G. Korneluk, *XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target*. Apoptosis, 2001. **6**(4): p. 253-61.
374. Holcik, M. and R.G. Korneluk, *XIAP, the guardian angel*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(7): p. 550-6.

375. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
376. Verhagen, A.M., et al., *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins*. Cell, 2000. **102**(1): p. 43-53.
377. Suzuki, Y., et al., *A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 613-21.
378. Yang, Q.H., et al., *Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis*. Genes Dev, 2003. **17**(12): p. 1487-96.
379. Hughes, P.D., et al., *Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity*. Immunity, 2008. **28**(2): p. 197-205.
380. Weant, A.E., et al., *Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction*. Immunity, 2008. **28**(2): p. 218-30.
381. Masson, F., et al., *Bid and Bim collaborate during induction of T cell death in persistent infection*. J Immunol, 2011. **186**(7): p. 4059-66.
382. Kam, C.M., D. Hudig, and J.C. Powers, *Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 307-23.
383. Antunes, F., E. Cadenas, and U.T. Brunk, *Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H2O2 is a consequence of lysosomal rupture*. Biochem J, 2001. **356**(Pt 2): p. 549-55.
384. Stoka, V., et al., *Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not procaspases, is the most likely route*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3149-57.
385. Houseweart, M.K., et al., *Apoptosis caused by cathepsins does not require Bid signaling in an in vivo model of progressive myoclonus epilepsy (EPM1)*. Cell Death Differ, 2003. **10**(12): p. 1329-35.
386. Jung, K.C., et al., *TCR-independent and caspase-independent apoptosis of murine thymocytes by CD24 cross-linking*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 795-802.
387. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
388. Smith, C.A., T. Farrah, and R.G. Goodwin, *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. Cell, 1994. **76**(6): p. 959-62.
389. Itoh, N. and S. Nagata, *A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 10932-7.
390. Orlinick, J.R., et al., *Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand*. J Biol Chem, 1997. **272**(46): p. 28889-94.
391. Scott, F.L., et al., *The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 1019-22.
392. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen*. J Immunol, 1992. **148**(4): p. 1274-9.
393. Miyawaki, T., et al., *Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood*. J Immunol, 1992. **149**(11): p. 3753-8.
394. Nishimura, Y., et al., *Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4395-403.

395. Liles, W.C., et al., *Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils.* J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 429-40.
396. Orlinick, J.R., K.B. Elkon, and M.V. Chao, *Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding.* J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32221-9.
397. Holler, N., et al., *Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(4): p. 1428-40.
398. Kayagaki, N., et al., *Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand.* J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1777-83.
399. Lettau, M., et al., *Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology.* Eur J Cell Biol, 2011. **90**(6-7): p. 456-66.
400. Oshimi, Y., et al., *Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells.* J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2909-15.
401. Oyaizu, N., et al., *Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+ T cells apoptosis: a possible mechanism of bystander cell death in HIV infection.* J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2456-63.
402. Bellgrau, D., et al., *A role for CD95 ligand in preventing graft rejection.* Nature, 1995. **377**(6550): p. 630-2.
403. Griffith, T.S., et al., *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege.* Science, 1995. **270**(5239): p. 1189-92.
404. Mincheff, M., et al., *Fas and Fas ligand expression on human peripheral blood leukocytes.* Vox Sang, 1998. **74**(2): p. 113-21.
405. Anel, A., et al., *T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A.* Eur J Immunol, 1994. **24**(10): p. 2469-76.
406. Mittelstadt, P.R. and J.D. Ashwell, *Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3744-51.
407. Eischen, C.M., et al., *ZAP-70 tyrosine kinase is required for the up-regulation of Fas ligand in activation-induced T cell apoptosis.* J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1135-9.
408. Zhong, L., et al., *Zeta-associated protein of 70 kDa (ZAP-70), but not Syk, tyrosine kinase can mediate apoptosis of T cells through the Fas/Fas ligand, caspase-8 and caspase-3 pathways.* J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1472-82.
409. Chow, W.A., J.J. Fang, and J.K. Yee, *The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells.* J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3512-8.
410. Feig, C., et al., *Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling.* EMBO J, 2007. **26**(1): p. 221-31.
411. Vignaux, F. and P. Golstein, *Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway?* Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 923-7.
412. Russell, J.H., et al., *Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4409-13.
413. Russell, J.H., et al., *Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2151-5.
414. LA, O.R., et al., *Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis.* Nature, 2009. **461**(7264): p. 659-63.

415. O'Connell, J., *Immune privilege or inflammation? The paradoxical effects of Fas ligand*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2000. **48**(2): p. 73-9.
416. Tanaka, M., et al., *Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes*. EMBO J, 1995. **14**(6): p. 1129-35.
417. Suda, T., et al., *Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 3918-24.
418. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1205-13.
419. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. Nature, 1992. **356**(6367): p. 314-7.
420. Takahashi, T., et al., *Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand*. Cell, 1994. **76**(6): p. 969-76.
421. Bettinardi, A., et al., *Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis*. Blood, 1997. **89**(3): p. 902-9.
422. Madkaikar, M., et al., *Advances in autoimmune lymphoproliferative syndromes*. Eur J Haematol, 2011. **87**(1): p. 1-9.
423. Adachi, M., et al., *Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 2131-6.
424. Adachi, M., R. Watanabe-Fukunaga, and S. Nagata, *Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1756-60.
425. Karray, S., et al., *Complete loss of Fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2118-25.
426. Herron, L.R., et al., *Selection of the T cell receptor repertoire in Lpr mice*. J Immunol, 1993. **151**(7): p. 3450-9.
427. Sidman, C.L., J.D. Marshall, and H. Von Boehmer, *Transgenic T cell receptor interactions in the lymphoproliferative and autoimmune syndromes of lpr and gld mutant mice*. Eur J Immunol, 1992. **22**(2): p. 499-504.
428. Wu, J., et al., *Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated lpr gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-lpr/lpr mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2344-8.
429. Hao, Z., et al., *Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 615-27.
430. Mabrouk, I., et al., *Prevention of autoimmunity and control of recall response to exogenous antigen by Fas death receptor ligand expression on T cells*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 922-33.
431. Hahne, M., et al., *Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1363-6.
432. Fukuzawa, K., et al., *Expression of fas/fas ligand (fasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC)*. J Gastroenterol, 2001. **36**(10): p. 681-8.

433. Shiraki, K., et al., *Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6420-5.
434. Okada, K., et al., *Frequency of apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes induced by fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(9): p. 3560-4.
435. O'Connell, J., et al., *The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1075-82.
436. Rabinowich, H., et al., *Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2579-88.
437. Seino, K., et al., *Antitumor effect of locally produced CD95 ligand*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 165-70.
438. Lichtenstein, A. and J. Kahle, *Anti-tumor effect of inflammatory neutrophils: characteristics of in vivo generation and in vitro tumor cell lysis*. Int J Cancer, 1985. **35**(1): p. 121-7.
439. Arai, H., et al., *Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13862-7.
440. Chappell, D.B., et al., *Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand*. Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 59-62.
441. Motz, G.T., et al., *Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors*. Nat Med, 2014.
442. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
443. Black, R.A., et al., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.
444. Chan, F.K., et al., *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2351-4.
445. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 149-60.
446. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.
447. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 411-52.
448. O'Hara, A.M., et al., *Tumor necrosis factor (TNF)-alpha-induced IL-8 expression in gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and AP endonuclease-1/redox factor (Ref)-1*. Cytokine, 2009. **46**(3): p. 359-69.
449. Balato, A., et al., *IL-33 is regulated by TNF-alpha in normal and psoriatic skin*. Arch Dermatol Res, 2014. **306**(3): p. 299-304.
450. Widera, D., et al., *Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling*. BMC Neurosci, 2006. **7**: p. 64.
451. Laouar, A., D. Glesne, and E. Huberman, *Involvement of protein kinase C-beta and ceramide in tumor necrosis factor-alpha-induced but not Fas-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23526-34.
452. MacEwan, D.J., *TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences*. Cell Signal, 2002. **14**(6): p. 477-92.
453. Calzascia, T., et al., *TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3833-45.

454. Mestan, J., et al., *Antiviral effects of recombinant tumour necrosis factor in vitro*. Nature, 1986. **323**(6091): p. 816-9.
455. Kroesen, S., et al., *Serious bacterial infections in patients with rheumatoid arthritis under anti-TNF-alpha therapy*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(5): p. 617-21.
456. Beutler, B., I.W. Milsark, and A.C. Cerami, *Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin*. Science, 1985. **229**(4716): p. 869-71.
457. Tanaka, T., Y. Hishitani, and A. Ogata, *Monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis: comparative effectiveness of tocilizumab with tumor necrosis factor inhibitors*. Biologics, 2014. **8**: p. 141-53.
458. Kollias, G., *TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity*. Semin Arthritis Rheum, 2005. **34**(5 Suppl1): p. 3-6.
459. Bandzar, S., S. Gupta, and M.O. Platt, *Crohn's disease: a review of treatment options and current research*. Cell Immunol, 2013. **286**(1-2): p. 45-52.
460. van Deventer, S.J., *Review article: targeting TNF alpha as a key cytokine in the inflammatory processes of Crohn's disease--the mechanisms of action of infliximab*. Aliment Pharmacol Ther, 1999. **13 Suppl 4**: p. 3-8; discussion 38.
461. Dempsey, P.W., et al., *The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 193-209.
462. Schneider-Brachert, W., et al., *Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles*. Immunity, 2004. **21**(3): p. 415-28.
463. Aspalter, R.M., M.M. Eibl, and H.M. Wolf, *Regulation of TCR-mediated T cell activation by TNF-RII*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 572-82.
464. Reddy, P., et al., *Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14608-14.
465. Aderka, D., et al., *Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors*. J Exp Med, 1992. **175**(2): p. 323-9.
466. Endres, R., et al., *Apparently normal tumor necrosis factor receptor 1 signaling in the absence of the silencer of death domains*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(18): p. 6609-17.
467. Schutze, S., V. Tchikov, and W. Schneider-Brachert, *Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(8): p. 655-62.
468. Devin, A., et al., *The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation*. Immunity, 2000. **12**(4): p. 419-29.
469. Zhou, A., et al., *Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference*. Oncogene, 2003. **22**(13): p. 2054-64.
470. Micheau, O., et al., *NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5299-305.
471. Chu, Z.L., et al., *Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10057-62.
472. Kelliher, M.A., et al., *The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 297-303.

473. Park, Y.H., M.S. Jeong, and S.B. Jang, *Death domain complex of the TNFR-1, TRADD, and RIP1 proteins for death-inducing signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(4): p. 1155-61.
474. Rothe, M., et al., *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1424-7.
475. Chan, F.K. and M.J. Lenardo, *A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 652-60.
476. Grech, A.P., et al., *Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) signaling is negatively regulated by a novel, carboxyl-terminal TNFR-associated factor 2 (TRAF2)-binding site*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31572-81.
477. Zheng, L., et al., *Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor*. Nature, 1995. **377**(6547): p. 348-51.
478. Nguyen, L.T., et al., *TNF receptor 1 (TNFR1) and CD95 are not required for T cell deletion after virus infection but contribute to peptide-induced deletion under limited conditions*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 683-8.
479. Gupta, S. and S. Gollapudi, *TNF-alpha-induced apoptosis in human naive and memory CD8+ T cells in aged humans*. Exp Gerontol, 2006. **41**(1): p. 69-77.
480. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
481. Hymowitz, S.G., et al., *A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL*. Biochemistry, 2000. **39**(4): p. 633-40.
482. Mariani, S.M. and P.H. Krammer, *Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage*. Eur J Immunol, 1998. **28**(3): p. 973-82.
483. Kayagaki, N., et al., *Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1451-60.
484. Kemp, T.J., J.M. Moore, and T.S. Griffith, *Human B cells express functional TRAIL/Apo-2 ligand after CpG-containing oligodeoxynucleotide stimulation*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 892-9.
485. Fanger, N.A., et al., *Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1155-64.
486. Zamai, L., et al., *Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2375-80.
487. Griffith, T.S., et al., *Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1343-54.
488. Kemp, T.J., et al., *Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3474-82.
489. Cretney, E., K. Takeda, and M.J. Smyth, *Cancer: novel therapeutic strategies that exploit the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(2): p. 280-6.
490. Cassatella, M.A., et al., *Interferon-activated neutrophils store a TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) intracellular pool that is readily mobilizable*

- following exposure to proinflammatory mediators. *J Leukoc Biol*, 2006. **79**(1): p. 123-32.
491. Degli-Esposti, M., *To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(5): p. 535-42.
 492. Wu, G.S., et al., *Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor*. *Cancer Res*, 1999. **59**(12): p. 2770-5.
 493. Schneider, P., et al., *Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(7): p. 5444-54.
 494. Chinnaiyan, A.M., et al., *Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95*. *Science*, 1996. **274**(5289): p. 990-2.
 495. Walczak, H., et al., *TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL*. *EMBO J*, 1997. **16**(17): p. 5386-97.
 496. Bodmer, J.L., et al., *Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(27): p. 20632-7.
 497. Hymowitz, S.G., et al., *Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5*. *Mol Cell*, 1999. **4**(4): p. 563-71.
 498. Hasegawa, H., et al., *Restricted expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 4 in human peripheral blood lymphocytes*. *Cell Immunol*, 2004. **231**(1-2): p. 1-7.
 499. Lum, J.J., et al., *Induction of cell death in human immunodeficiency virus-infected macrophages and resting memory CD4 T cells by TRAIL/Apo2l*. *J Virol*, 2001. **75**(22): p. 11128-36.
 500. Renshaw, S.A., et al., *Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL*. *J Immunol*, 2003. **170**(2): p. 1027-33.
 501. Kischkel, F.C., et al., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 46639-46.
 502. Degli-Esposti, M.A., et al., *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 813-20.
 503. Janssen, E.M., et al., *CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death*. *Nature*, 2005. **434**(7029): p. 88-93.
 504. Zhang, X.R., et al., *Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(2): p. 203-10.
 505. Katsikis, P.D., et al., *Interleukin-1 beta converting enzyme-like protease involvement in Fas-induced and activation-induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection. TNF-related apoptosis-inducing ligand can mediate activation-induced T cell death in HIV infection*. *J Exp Med*, 1997. **186**(8): p. 1365-72.
 506. Grimm, M., et al., *Tumour-mediated TRAIL-Receptor expression indicates effective apoptotic depletion of infiltrating CD8+ immune cells in clinical colorectal cancer*. *Eur J Cancer*, 2010. **46**(12): p. 2314-23.

507. Zhuang, L., et al., *Progression in melanoma is associated with decreased expression of death receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. Hum Pathol, 2006. **37**(10): p. 1286-94.
508. Takeda, K., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 94-100.
509. Roos, C., et al., *Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1593-605.
510. Chicheportiche, Y., et al., *TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32401-10.
511. Pradet-Balade, B., et al., *An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein*. EMBO J, 2002. **21**(21): p. 5711-20.
512. Kaplan, M.J., et al., *TRAIL (Apo2 ligand) and TWEAK (Apo3 ligand) mediate CD4+ T cell killing of antigen-presenting macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2897-904.
513. Nakayama, M., et al., *Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1373-80.
514. Bodmer, J.L., et al., *TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95)*. Immunity, 1997. **6**(1): p. 79-88.
515. Marsters, S.A., et al., *Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3*. Curr Biol, 1998. **8**(9): p. 525-8.
516. Zhang, Y.C., et al., *The role of death receptor 3 in the biological behavior of hepatocellular carcinoma cells*. Mol Med Rep, 2014.
517. Gout, S., et al., *Death receptor-3, a new E-Selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MAPK activation*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9117-24.
518. Kaptein, A., et al., *Studies on the interaction between TWEAK and the death receptor WSL-1/TRAMP (DR3)*. FEBS Lett, 2000. **485**(2-3): p. 135-41.
519. Wiley, S.R., et al., *A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 837-46.
520. Whitsett, T.G., et al., *Elevated expression of Fn14 in non-small cell lung cancer correlates with activated EGFR and promotes tumor cell migration and invasion*. Am J Pathol, 2012. **181**(1): p. 111-20.
521. Willis, A.L., et al., *The fibroblast growth factor-inducible 14 receptor is highly expressed in HER2-positive breast tumors and regulates breast cancer cell invasive capacity*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(5): p. 725-34.
522. Son, A., et al., *TWEAK/Fn14 pathway promotes a T helper 2-type chronic colitis with fibrosis in mice*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(6): p. 1131-42.
523. Wang, D., et al., *TWEAK/Fn14 promotes apoptosis of human endometrial cancer cells via caspase pathway*. Cancer Lett, 2010. **294**(1): p. 91-100.
524. Schneider, P., et al., *TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1*. Eur J Immunol, 1999. **29**(6): p. 1785-92.
525. Lynch, C.N., et al., *TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8455-9.

526. Saas, P., et al., *TWEAK stimulation of astrocytes and the proinflammatory consequences*. *Glia*, 2000. **32**(1): p. 102-7.
527. Zeng, L., et al., *Death receptor 6 induces apoptosis not through type I or type II pathways, but via a unique mitochondria-dependent pathway by interacting with Bax protein*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(34): p. 29125-33.
528. Nikolaev, A., et al., *APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases*. *Nature*, 2009. **457**(7232): p. 981-9.
529. Zhao, H., et al., *Impaired c-Jun amino terminal kinase activity and T cell differentiation in death receptor 6-deficient mice*. *J Exp Med*, 2001. **194**(10): p. 1441-8.
530. Schmidt, C.S., et al., *Enhanced B cell expansion, survival, and humoral responses by targeting death receptor 6*. *J Exp Med*, 2003. **197**(1): p. 51-62.
531. Huijbers, I.J., et al., *An inducible mouse model of melanoma expressing a defined tumor antigen*. *Cancer Res*, 2006. **66**(6): p. 3278-86.
532. Chin, L., et al., *Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo*. *Genes Dev*, 1997. **11**(21): p. 2822-34.
533. Shanker, A., et al., *Thymocyte-intrinsic genetic factors influence CD8 T cell lineage commitment and affect selection of a tumor-reactive TCR*. *J Immunol*, 2004. **172**(8): p. 5069-77.
534. Van den Eynde, B., et al., *The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice*. *J Exp Med*, 1991. **173**(6): p. 1373-84.
535. Uyttenhove, C., et al., *The expression of mouse gene P1A in testis does not prevent safe induction of cytolytic T cells against a P1A-encoded tumor antigen*. *Int J Cancer*, 1997. **70**(3): p. 349-56.
536. Coulie, P.G., et al., *Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen*. *Immunol Rev*, 2002. **188**: p. 33-42.
537. Lethe, B., et al., *Mouse tumor rejection antigens P815A and P815B: two epitopes carried by a single peptide*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(9): p. 2283-8.
538. Fallarino, F., et al., *Th1 and Th2 cell clones to a poorly immunogenic tumor antigen initiate CD8+ T cell-dependent tumor eradication in vivo*. *J Immunol*, 2000. **165**(10): p. 5495-501.
539. Bai, X.F., et al., *Different lineages of P1A-expressing cancer cells use divergent modes of immune evasion for T-cell adoptive therapy*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 8241-9.
540. Gajewski, T.F., et al., *Costimulation with B7-1, IL-6, and IL-12 is sufficient for primary generation of murine antitumor cytolytic T lymphocytes in vitro*. *J Immunol*, 1995. **154**(11): p. 5637-48.
541. Brandle, D., et al., *The shared tumor-specific antigen encoded by mouse gene P1A is a target not only for cytolytic T lymphocytes but also for tumor rejection*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(12): p. 4010-9.
542. Silla, S., et al., *Enhancement by IL-12 of the cytolytic T lymphocyte (CTL) response of mice immunized with tumor-specific peptides in an adjuvant containing QS21 and MPL*. *Eur Cytokine Netw*, 1999. **10**(2): p. 181-90.
543. Fallarino, F., et al., *Improved efficacy of dendritic cell vaccines and successful immunization with tumor antigen peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells by coadministration of recombinant murine interleukin-12*. *Int J Cancer*, 1999. **80**(2): p. 324-33.

544. Colmenero, P., P. Liljestrom, and M. Jondal, *Induction of P815 tumor immunity by recombinant Semliki Forest virus expressing the P1A gene*. *Gene Ther*, 1999. **6**(10): p. 1728-33.
545. Bilsborough, J., et al., *TNF-mediated toxicity after massive induction of specific CD8+ T cells following immunization of mice with a tumor-specific peptide*. *J Immunol*, 2002. **169**(6): p. 3053-60.
546. Soudja, S.M., et al., *Tumor-initiated inflammation overrides protective adaptive immunity in an induced melanoma model in mice*. *Cancer Res*, 2010. **70**(9): p. 3515-25.
547. Soudja, S.M., et al., *Disrupted lymph node and splenic stroma in mice with induced inflammatory melanomas is associated with impaired recruitment of T and dendritic cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22639.
548. Landsberg, J., et al., *Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation*. *Nature*, 2012. **490**(7420): p. 412-6.
549. De Plaen, E., et al., *Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(7): p. 2274-8.
550. Willmsky, G., et al., *Immunogenicity of premalignant lesions is the primary cause of general cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness*. *J Exp Med*, 2008. **205**(7): p. 1687-700.
551. Svane, I.M., et al., *Interferon-gamma-induced MHC class I expression and defects in Jak/Stat signalling in methylcholanthrene-induced sarcomas*. *Scand J Immunol*, 1997. **46**(4): p. 379-87.
552. Hailemichael, Y., et al., *Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8(+) T cell sequestration, dysfunction and deletion*. *Nat Med*, 2013. **19**(4): p. 465-72.
553. Spranger, S., et al., *Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(200): p. 200ra116.
554. Chen, J., et al., *Interferon-gamma-induced PD-L1 surface expression on human oral squamous carcinoma via PKD2 signal pathway*. *Immunobiology*, 2012. **217**(4): p. 385-93.
555. Schouppe, E., et al., *Modulation of CD8(+) T-cell activation events by monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cells*. *Immunobiology*, 2013. **218**(11): p. 1385-91.
556. Van Baren, N. and B. Van den Eynde, *Tryptophane-degrading enzymes in tumoral immune resistance*. *Frontiers in Immunology*, 2015. **6**(34).
557. Schouppe, E., et al., *Tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subsets exert either inhibitory or stimulatory effects on distinct CD8+ T-cell activation events*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(11): p. 2930-42.
558. Vincent, J., et al., *5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity*. *Cancer Res*, 2010. **70**(8): p. 3052-61.
559. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-8.
560. Ochsenbein, A.F., et al., *Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2233-8.

561. DuPage, M., et al., *Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 405-9.
562. Willimsky, G. and T. Blankenstein, *Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance*. Nature, 2005. **437**(7055): p. 141-6.
563. DuPage, M., et al., *Endogenous T cell responses to antigens expressed in lung adenocarcinomas delay malignant tumor progression*. Cancer Cell, 2011. **19**(1): p. 72-85.
564. Weide, B., et al., *Myeloid-derived suppressor cells predict survival of patients with advanced melanoma: comparison with regulatory T cells and NY-ESO-1- or melan-A-specific T cells*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(6): p. 1601-9.
565. Movahedi, K., et al., *Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4233-44.
566. Zeisberger, S.M., et al., *Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach*. Br J Cancer, 2006. **95**(3): p. 272-81.
567. Priceman, S.J., et al., *Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy*. Blood, 2010. **115**(7): p. 1461-71.
568. Maher, S., et al., *Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(2): p. 131-7.
569. Strater, J., et al., *CD95 ligand (CD95L) immunohistochemistry: a critical study on 12 antibodies*. Cell Death Differ, 2001. **8**(3): p. 273-8.
570. Cefai, D., et al., *Role of Fas ligand expression in promoting escape from immune rejection in a spontaneous tumor model*. Int J Cancer, 2001. **91**(4): p. 529-37.
571. Houston, A., et al., *Fas ligand expressed in colon cancer is not associated with increased apoptosis of tumor cells in vivo*. Int J Cancer, 2003. **107**(2): p. 209-14.
572. Niehans, G.A., et al., *Human lung carcinomas express Fas ligand*. Cancer Res, 1997. **57**(6): p. 1007-12.
573. Bennett, M.W., et al., *The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma*. J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5669-75.
574. Restifo, N.P., *Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 493-5.
575. Naujokat, C., O. Sezer, and K. Possinger, *Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma induce expression of functional Fas ligand on HT29 and MCF7 adenocarcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **264**(3): p. 813-9.
576. Guo, C.L., et al., *Expression of Fas/FasL in CD8+ T and CD3+ Foxp3+ Treg cells--relationship with apoptosis of circulating CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma patients*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(6): p. 2613-8.
577. Zhou, Q., et al., *Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia*. Blood, 2009. **114**(18): p. 3793-802.
578. Hildeman, D.A., et al., *T cell apoptosis and reactive oxygen species*. J Clin Invest, 2003. **111**(5): p. 575-81.

579. Hildeman, D.A., et al., *Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 759-67.
580. Bauer, M.K., et al., *Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8048-55.
581. Corzo, C.A., et al., *HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment*. J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2439-53.
582. Braeuer, R.R., et al., *The sweet and bitter sides of galectins in melanoma progression*. Pigment Cell Melanoma Res, 2012. **25**(5): p. 592-601.
583. De Santo, C., et al., *Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4185-90.
584. Andersen, M.H., *The specific targeting of immune regulation: T-cell responses against Indoleamine 2,3-dioxygenase*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(8): p. 1289-97.
585. Iversen, T.Z., et al., *Long-lasting disease stabilization in the absence of toxicity in metastatic lung cancer patients vaccinated with an epitope derived from indoleamine 2,3 dioxygenase*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(1): p. 221-32.
586. Feig, C., et al., *Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(50): p. 20212-7.
587. Warnier, G., et al., *Induction of a cytolytic T-cell response in mice with a recombinant adenovirus coding for tumor antigen P815A*. Int J Cancer, 1996. **67**(2): p. 303-10.
588. Smerdou, C. and P. Liljestrom, *Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1092-8.
589. Liljestrom, P. and H. Garoff, *A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(12): p. 1356-61.