

Université de Montréal

**Étude de l'endocytose du récepteur PD-1 dans  
les lymphocytes T humains**

par

Elham Ben Saad

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)  
en biologie moléculaire

Août 2019

© Elham Ben Saad, 2019

# RÉSUMÉ

PD-1 (*Programmed Cell death protein -1*) est un récepteur co-inhibiteur exprimé à la surface de lymphocytes T (LT) activés. Ce récepteur joue un rôle important dans le maintien de la tolérance périphérique tout en protégeant contre les maladies auto-immunes et inflammatoires. Cependant, une expression élevée et permanente de PD-1 et ses ligands PD-L1 et PD-L2 (PD-Ls) perturbe la réponse immunitaire contre les pathogènes et les cellules tumorales.

Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ICI) ciblant l'axe PD-1/PD-Ls représentent aujourd'hui un avancé majeur dans le traitement de différents types de cancer, tant sur le plan de l'efficacité que de la tolérance. Le nivolumab (nivo) et le pembrolizumab (pembro) sont deux anticorps monoclonaux (AcM) anti-PD-1 qui bloquent l'interaction de PD-1 avec ses ligands. Ces AcM ont montré des résultats prometteurs dans le traitement de multiples types de cancers comme le mélanome, le cancer bronchique non à petites cellules, le carcinome à cellules rénales, etc.

Malgré l'importance thérapeutique de nivo et de pembro dans le cancer, aucune étude n'a défini le devenir de PD-1 après la liaison à ces deux AcM.

L'objectif de cette étude a été donc d'évaluer l'endocytose de PD-1 suite au liaison à des AcM anti-PD-1 (clone J110, nivo, pembro) et de déterminer s'il y a différence entre nivo et pembro vis à vis leur capacités à induire l'internalisation de PD-1.

L'étude de l'endocytose de PD-1 a été réalisé sur des LT humains obtenus à partir du sang périphérique de donneurs sains et activés avec des Ac anti-CD3/anti-CD28 ou concanavoline A afin d'exprimer le récepteur PD-1. L'analyse des données par cytométrie en flux a montré que l'engagement de PD-1 avec l'Ac anti-PD-1 (clone J110) induit son endocytose dans les LT humains et que 50% de la totalité de PD-1 de surface est internalisé dans les premiers 30 minutes suivant l'incubation de cellules à 37°C, suivi d'un taux d'endocytose plus lent (56% en 60min).

Notre étude a montré également que la liaison de nivo et de pembro au PD-1 induit son endocytose et que la plupart de récepteur est internalisé dans les 30 min suivant l'incubation de cellules à 37°C. Toutefois, 32 à 50% des récepteurs sont résistants à l'endocytose.

L'analyse comparative de nivo et de pembro a révélé une différence statistiquement significative ( $p=0.03$ ) entre le taux d'internalisation du complexe PD-1/nivo et celui du PD-1/pembro (46% versus 25% en 30min, respectivement).

Même à des concentrations élevées de pembro, la liaison de nivo induit une meilleure internalisation de PD-1, ce qui suggère que nivo pourrait être plus efficace.

En outre, nous avons trouvé que l'endocytose de PD-1 est inhibé en présence d'une solution hypertonique de sucrose, connu comme inhibiteur de l'endocytose par vésicules de clathrine. L'internalisation de PD-1 se fait donc par voie dépendante de clathrine,

Bien que les ICI comme nivo et pembro sont connus de bloquer l'interaction de PD-1 avec ses ligands, PD-L1 et PD-L2, notre étude a montré pour la première fois que ce deux AcM induisent aussi l'endocytose du récepteur PD-1 dans les LT humains avec des taux différents, et que 32% à 50% de récepteurs PD-1 sont résistants à l'endocytose. Ces résultats pourraient être exploités pour améliorer l'internalisation de PD-1 dans les LT humains et par la suite augmenter les potentiels thérapeutiques de nivolumab et de pembrolizumab dans le traitement du cancer.

**Mots clés :** Récepteur PD-1, Ligands de PD-1, Lymphocytes T, Inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, Anticorps anti-PD-1, Nivolumab, Pembrolizumab, Endocytose, Cancer

# ABSTRACT

PD-1 (Programmed Cell death protein -1) is a co-inhibitory receptor expressed on the surface of activated T cells. It plays an important role in maintaining peripheral tolerance and protecting against autoimmune and inflammatory diseases. However, permanent expression of PD-1 and its ligands PD-L1/ PD-L2 (PD-Ls) disrupts the immune response against pathogens and tumor cells.

Immune checkpoint blockade (ICB) targeting the PD-1/PD-Ls axis has revolutionized the treatment of many cancers. Nivolumab (nivo) and pembrolizumab (pembro) are two anti-PD-1 monoclonal antibodies (mAb) that block the interaction between PD-1 and its ligands. They have shown promising results in the treatment of multiple types of cancers such as melanoma, non-small cell lung cancer, renal cell carcinoma, etc.

Surprisingly, despite the success of anti-PD-1 in cancer immunotherapy, no-one has defined the destiny of surface PD-1 following antibody binding. Therefore, the objective of my master thesis was to define the fate of surface PD-1 following antibody binding and whether different anti-PD-1 Abs in the clinic differ in their ability to induce PD-1 endocytosis.

The study of PD-1 endocytosis was performed on human T lymphocytes obtained from peripheral blood of healthy donors and activated with anti-CD3/anti-CD28 Ab or concanavalin A to get PD-1 expression. Data analysis by flow cytometry showed that following anti-PD-1 Ab binding, 50% of PD-1 becomes endocytosed by 30min.

In addition, we found that the PD-1 receptor is internalised upon its engagement with nivo and pembro and that most of the receptor is endocytosed within 30 min. However, 32 to 50% of the receptors are resistant to endocytosis.

The comparative analysis of nivo and pembro has revealed a statistically significant difference ( $p=0.03$ ) between the internalisation rate of the PD-1/nivo complex versus PD-1/pembro (46% versus 25% by 30min, respectively). Even at high concentrations of pembro, nivo induces better internalization of PD-1, suggesting that nivo could be more effective than pembro.

Moreover, we found that PD-1 endocytosis is inhibited by incubation in 0.45M sucrose hypertonic medium which is known as an inhibitor of coated-pits-mediated endocytosis. These results suggest that PD-1 is internalized through clathrin-dependent pathway.

Our study showed for the first time that ICB involves not only in the blockade of PD-1/PD-Ls interaction, but also in the endocytosis of PD-1 receptors from the surface of human T-cells, which

differs between nivolumab and pembrolizumab. These results could be exploited to increase the therapeutic potential of nivolumab and pembrolizumab in cancer treatment.

**Keywords:** PD-1 receptor, PD-1 ligands, T lymphocytes, Immune checkpoint blockade, Anti-PD1 antibodies, Nivolumab, Pembrolizumab, Endocytosis, Cancer

# TABLE DES MATIERES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>X</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>1</b>
1. LE PD-1, DE LA DÉCOUVERTE JUSQU'AU APPLICATIONS CLINIQUES :.....	2
1.1. <i>Introduction</i> : .....	2
1.2. <i>Le récepteur PD-1</i> : .....	4
1.3. <i>Fonctions biologiques de PD-1</i> :.....	9
1.4. <i>Immunothérapie du cancer: Un défi en plusieurs étapes</i> .....	16
1.5. <i>Perspectives cliniques et voies de recherche</i> :.....	22
2. ENDOCYTOSE : .....	23
2.1 <i>Endocytose dépendante de vésicules de clathrine (EDC)</i> : .....	24
2.2 <i>Endocytose des récepteurs à tyrosine kinase</i> :.....	29
3. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS : .....	30
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>31</b>
1. MATÉRIEL: .....	32
1.1 <i>Cellules</i> :.....	32
1.2 <i>Réactifs</i> : .....	32
2. MÉTHODES : .....	33
2.1 <i>Isolement de cellules mononuclées du sang périphérique (CMN)</i> : .....	33
2.2 <i>Stimulation des CMN et expression du récepteur PD-1</i> : .....	34
2.3 <i>Étude de l'endocytose du récepteur PD-1 après liaison à l'Ac anti-PD1</i> .....	34
<i>(clone J110) dans les LT humains</i> :.....	34
2.4 <i>Caractérisation de nivo et de pembro in vitro</i> : .....	39
2.5 <i>Étude de l'endocytose du récepteur PD-1 après liaison au nivo et/ou pembro dans les LT humains par la méthode de downmodulation</i> : .....	41
2.6 <i>Étude de l'endocytose de PD-1 par microscopie à fluorescence</i> :.....	41

2.7	<i>Détermination de la voie impliquée dans l'endocytose du récepteur PD-1 dans les LT humains :</i>	42
2.8	<i>Collecte et analyse des données :</i>	42
<b>RÉSULTATS</b>		<b>44</b>
1.	ÉTUDE DE L'ENDOCYTOSE DU RÉCEPTEUR PD-1 DANS LES LT HUMAINS APRÈS LIAISON AUX AC ANTI-PD-1 (CLONE J110) :	45
1.1-	<i>Internalisation du récepteur PD-1 dans les LT humains :</i>	45
1.2-	<i>Régulation négative du récepteur PD-1 dans les cellules T humaines :</i>	49
2.	ÉTUDE DE L'ENDOCYTOSE DU RÉCEPTEUR CD28 DANS LES LT HUMAINS :	52
3.	ÉTUDE DE L'ENDOCYTOSE DU RÉCEPTEUR PD-1 DANS LES LT HUMAINS APRÈS LIAISON AU NIVOLUMAB ET/OU PEMBROLIZUMAB :	54
4.	IDENTIFICATION DE LA VOIE IMPLIQUÉE DANS L'ENDOCYTOSE DE RÉCEPTEURS PD-1 DANS LES LT HUMAINS:	64
<b>DISCUSSION</b>		<b>68</b>
1-	ENDOCYTOSE DU PD-1 DANS LES LT HUMAINS APRÈS LIAISON AUX AC ANTI-PD-1 (CLONE J110) :	69
2-	CARACTÉRISATION DE NIVO ET DE PEMBRO <i>IN VITRO</i> :	70
3-	ENDOCYTOSE DE PD-1 DANS LES LT HUMAINS APRÈS LIAISON AU NIVO ET/OU PEMBRO:	71
4-	VOIE IMPLIQUÉE DANS L'ENDOCYTOSE DE PD-1 :	74
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>		<b>75</b>
<b>FIGURES SUPPLÉMENTAIRES</b>		<b>77</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		<b>81</b>

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :Récepteurs activateurs et inhibiteurs à la surface de LT et leurs ligands correspondants à la surface de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (10) .....</b>	<b>3</b>
<b>Figure 2: Les signaux nécessaires à l'activation optimale de LT (3) .....</b>	<b>4</b>
<b>Figure 3: Structure du PD-1 en comparaison avec celle de CTLA-4 (Figure modifiée de (18)).....</b>	<b>5</b>
<b>Figure 4: Expression relative (A) et régulation du PD-1 et ses ligands (B) (8) .....</b>	<b>7</b>
<b>Figure 5: Mécanisme de signalisation du PD-1 dans les LT (Figure modifiée de (2)) .....</b>	<b>9</b>
<b>Figure 6: Rôle de PD-1 dans le maintien de la tolérance de cellules T (8) .....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 7:Rôle de PD-1 dans les infections virales et dans l'auto-immunité (Figure modifiée de (2)).....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 8: Processus d'immunoediting (Figure modifiée de (46)).....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 9: Deux mécanismes pour l'expression de ligand de PD-1 (PD-L1) sur les cellules tumorales (Figure modifiée de (48)).....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 10: Blocage de CTLA-4 et de la voie PD-1/PD-L1 par des anticorps monoclonaux afin d'induire la réponse antitumorale de LT (7) .....</b>	<b>18</b>
<b>Figure 11: Structure cristallographique de l'ectodomaine de PD-1 en complexe avec le fragment Fab de nivo (61).....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 12:Structure cristallographique de l'ectodomaine de PD-1 en complexe avec le fragment pembro (71) .....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 13:Les mécanismes d'endocytose (macropinocytose, phagocytose et micropinocytose) (Figure modifiée de (83)).....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 14:Les voies d'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine (Figure modifiée de (84)) .....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 15: Les cinq étapes de formation d'une vésicule de clathrine (Figure modifiée de (84)).....</b>	<b>25</b>



<b>Figure 16: Organisation structurale du triskèle de clathrine (A) et structure de la cage de clathrine obtenue par microscopie cryo-électronique (B) (91).</b>	<b>27</b>
<b>Figure 17: Anneau d'aphérèse ou LRS chamber</b>	<b>32</b>
<b>Figure 18: Isolement de cellules mononuclées par la méthode de Ficoll-Hypaque (101)</b>	<b>34</b>
<b>Figure 19: Analyse par cytométrie en flux de LT humains incubés à 4°C ou à 37°C à différents temps et traités avec le PBS acidifié</b>	<b>45</b>
<b>Figure 20: Taux moyen d'internalisation du récepteur PD-1 dans les lymphocytes T humains en fonction du temps d'incubation (min)</b>	<b>46</b>
<b>Figure 21: Expression initiale de PD-1 sur les LT incubés à 4°C pendant 90 min et non traités avec le PBS acidifié (A), et fréquence de cellules internalisant le récepteur PD-1 (B)</b>	<b>47</b>
<b>Figure 22: Taux d'internalisation du récepteur PD-1 dans les cellules T humaines</b>	<b>48</b>
<b>Figure 23: Analyse par microscopie à fluorescence de l'internalisation de récepteur PD-1 dans les cellules T humaines (grossissement : x63)</b>	<b>49</b>
<b>Figure 24: Analyse par cytométrie en flux de la régulation du complexe PD-1/anti-PD-1 dans les cellules T humaines en fonction du temps d'incubation (min)</b>	<b>50</b>
<b>Figure 25: Régulation négative moyenne du récepteur PD-1 dans les cellules T humaines en fonction de temps d'incubation (min) (nombre d'expérience=4)</b>	<b>51</b>
<b>Figure 26: Fréquence de cellules T exprimant le récepteur PD-1 à la surface</b>	<b>51</b>
<b>Figure 27: Taux d'internalisation moyen du récepteur CD28 dans les LT humains (n=4)</b>	<b>52</b>
<b>Figure 28: Régulation négative moyenne du récepteur CD28 dans les LT humains (n=4)</b>	<b>52</b>
<b>Figure 29: Comparaison entre l'internalisation de récepteur PD-1 et celui de CD28</b>	<b>53</b>
<b>Figure 30: Comparaison entre la régulation négative de récepteur PD-1 et celle de CD28</b>	<b>53</b>
<b>Figure 31: Analyse par cytométrie en flux de site de liaison de nivo et de pembro vis à vis le récepteur PD-1 dans les LT humains</b>	<b>54</b>
<b>Figure 32: Analyse par cytométrie en flux de l'affinité de nivo et de pembro vis à vis le récepteur PD-1 dans les LT humains</b>	<b>55</b>

<b>Figure 33: Analyse par cytométrie en flux de la régulation du complexe PD1/nivo dans les LT humains en fonction de temps (min).....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 34: Régulation négative moyenne du complexe PD1/nivo dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=5) .....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 35: Analyse par microscopie à fluorescence de l'internalisation du récepteur PD-1 après liaison au nivolumab dans les LT humains (grossissement x63) .....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 36: Analyse par cytométrie en flux de la régulation négative du complexe PD1/pembro dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min).....</b>	<b>59</b>
<b>Figure 37: Régulation négative moyenne du complexe PD-1/pembro .....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 38: Comparaison entre la régulation négative moyenne du complexe PD-1/ nivo versus PD-1/pembro dans le LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=5) .</b>	<b>61</b>
<b>Figure 39: Fréquence des LT exprimant le récepteur PD-1 à leur surface après liaison au nivo ou pembro en fonction du temps d'incubation (min) (n=5).....</b>	<b>61</b>
<b>Figure 40: Comparaison entre la régulation négative du complexe PD-1/ nivo versus PD-1/pembro dans le LT humains (Concentration de nivo ou pembro=5µg/ml) (n=3) .....</b>	<b>62</b>
<b>Figure 41: Comparaison entre la régulation négative du complexe PD-1/ nivo versus PD-1/pembro dans le LT humains (Concentration de nivo ou pembro=10µg/ml) (n=3) .....</b>	<b>62</b>
<b>Figure 42: Comparaison entre la régulation négative des complexes PD-1/ nivo versus PD-1/pembro versus PD-1/nivo+pembro dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=3).....</b>	<b>63</b>
<b>Figure 43: Analyse par cytométrie en flux de l'internalisation du récepteur PD-1 dans les LT humains en absence ou présence de sucrose en fonction du temps d'incubation (min) .</b>	<b>64</b>
<b>Figure 44: Effet du sucrose (0.45M) sur l'internalisation du récepteur PD-1 dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=3).....</b>	<b>65</b>
<b>Figure 45: Effet de sucrose (0.45M) sur la régulation négative du complexe PD-1/nivo dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=4) .....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 46: Effet de sucrose (0.45M) sur la régulation négative du complexe PD-1/pembro dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=4) .....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 47: Effet du sucrose (0.45M) sur l'internalisation de CD28 dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=3) .....</b>	<b>67</b>

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac :	Anticorps
AcM :	Anticorps monoclonaux
ADCC :	<i>Anticorps Dependant Cytotoxicity Cells</i>
AF488 :	Alexa Fluor 488
AF647 :	Alexa Fluor 647
Ag :	Antigène
AP-1 :	<i>Activator Protein-1</i>
AP-2 :	<i>Adaptor Protein-2</i> (protéine adaptatrice-2)
BATF:	<i>Basic leucine zipper Transcription Factor ATF-like</i>
BCR:	<i>B Cell Receptor</i> (Récepteur de LB)
CBNPC:	Cancer Bronchique Non à Petite Cellule
CCP :	<i>Clathrin Coated Pits</i> (Puits recouverts de clathrine)
CCR:	Carcinome à Cellules Rénales
CCV :	<i>Clathrin Coated Vesicle</i> (Vésicule recouverte de clathrine)
CD:	Cellule Dendritique
CDR:	<i>Complementary Determining Region (CDR)</i>
CF:	Cytométrie en Flux
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMN :	Cellules Mononuclées
conA :	Concanavaline-A
CPA:	Cellule Présentatrice d'Antigène

CTLA-4 : *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*

EDC: Endocytose Dépendante de Clathrine

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

EPS15: *EGFR pathway substrate 15*

Fab: *Fragment antigen binding*

FBS : *Fetal Bovin Serum* (Sérum de veau foetal)

FDA : *Food and Drug Administration*

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

GSK-3: Glycogène Synthase Kinase-3

HCl : Acide Chlorhydrique

ICI : Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire

IFN $\gamma$  : Interféron- $\gamma$

IL: Interleukine

ITIM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*

ITSM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*

Kd: Constante de dissociation

LB: Lymphocyte B

LCMV : *Lymphocytic Choriomeningitis virus*

LDLR : *Low Density lipoprotein Receptor* (Récepteur de lipoprotéines à faible densité)

LRSC : *LeucoReduction System Chamber*

LT : Lymphocytes T

NaCl : Chlorure de Sodium

NF-kB : *Nuclear Factor-kappa B*

NFAT: *Nuclear Factor of Activated T cells*

NFATc1: *Nuclear Factor of Activated T cells c1*

NOD : *non-obese diabetic*

PBMC: Cellules mononuclées du sang périphérique

PBS : *Phosphate Buffered saline*

PD-1 : *Programmed cell Death protein-1*

PD-Ls : *Programmed Death ligands*

PE : Phycoérythrine

PI-3K: *Phosphatidyl-inositol 3 kinase*

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

RTK : Récepteur à Tyrosine Kinase

SHP-1 : *Src Homology-2-containing tyrosine Phosphatase-1*

SHP-2: *Src Homology-2-containing tyrosine Phosphatase-2*

TCR : *T Cell Receptor* (Récepteur de LT)

Teff: Cellules T effectrices

TF: *Transcription Factor* (Facteur de transcription)

TFR : *Transferrin Receptor* (Récepteur de transferrine)

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

Treg : Cellules T régulatrices

ZAP-70 : *Zeta-chain Associated Protein kinase 70*

*Je dédie ce mémoire de fin d'études de Maitrise*

*À ma très chère fille, Mayane*

*À mon cher époux, Zied*

*À mes chers parents*

*À mes chères sœurs*

*À toute ma famille*

*À mes amis, mes collègues d'études*

*À tous ceux qui ont contribué à ce travail de proche ou de loin*

## REMERCIEMENTS

C'est avec un réel plaisir que je réserve ces quelques lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. Christopher E. Rudd, professeur de Médecine à l'Université de Montréal et chef de l'axe immunologie-oncologie au centre de recherche de HMR, pour son accueil au sein de son laboratoire, pour avoir contribué à ma formation ainsi que le partage de son immense savoir. Ce travail découle de son expertise et ses compétences reconnus mondialement notamment dans la signalisation de lymphocytes T. J'exprime mes plus profonds respects et remerciements envers Dr. Christopher E. Rudd pour son aide quotidien et ses précieux conseils, ses explications et surtout sa patience. J'espère que par les présents mots il a pu ressentir toute la gratitude et la reconnaissance que j'ai envers lui.

Mes remerciements s'adressent également à tous mes collègues, mais aussi amis, du laboratoire. Je remercie Janna pour son aide, ses éclaircissements et ses conseils. Je tiens à remercier Alex pour ses commentaires et ses suggestions. Un grand merci à François pour sa disponibilité, son aide et ses conseils. Hien, chère amie, merci pour ton sourire, ta sympathie et ta bonne humeur. Merci également à Saloua, Catherine, Mark, Snow, Andreas, Sylvia et Meriem. Je souhaite à vous tous plein de bonnes choses pour vos projets futurs.

Un merci tout spécial et chaleureux à ma chère petite fille, Mayane, et à mon cher époux, Zied, pour leur affection, leur amour et leur patience.

Je n'oublie pas de remercier tous ceux qui, au Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve Rosemont comme à l'Université de Montréal, ont été gentils et serviables avec moi.

Pour finir, j'aimerais remercier les membres de jury d'évaluation de mon mémoire pour leur acceptation d'évaluer ce travail, pour leur précieux temps, pour leurs commentaires et pour leurs corrections.



## AVANT-PROPOS

La réponse immunitaire des lymphocytes T (LT) est hautement régulée par des signaux provenant des récepteurs co-stimulateurs et co-inhibiteurs, assurant un équilibre optimal entre la réactivité immunitaire aux antigènes et le maintien de la tolérance du soi (1). Parmi les récepteurs co-inhibiteurs, appelé aussi points de contrôle immunitaires, on cite le récepteur PD-1 (*programmed cell death protein -1*).

Après la liaison à ses ligands correspondants PD-L1 et PD-L2 (PD-Ls), le récepteur PD-1 joue un rôle important dans la protection contre les maladies auto-immunes et inflammatoires (2). Cependant, une expression élevée et permanente de PD-1 et ses ligands perturbe la réponse immunitaire contre les pathogènes et les cellules tumorales (3).

Plusieurs épreuves ont montré que le développement et la progression de la tumeur s'accompagnent de la formation d'un microenvironnement tumoral spécial (4) . En effet, les cellules tumorales sont capables d'échapper au système immunitaire par différents mécanismes, y compris la surexpression des ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2. L'interaction du PD-1, exprimé sur les LT infiltrant la tumeur, avec ses ligands inhibe la réponse anti-tumorale de LT et par la suite favoriser la progression et l'invasion du cancer (5).

Bloquer la voie PD-1/PD-Ls par des anticorps monoclonaux restaure donc les fonctions effectrices de LT et par la suite contribuer à l'éradication du tumeur.

L'immunothérapie par inhibiteurs de point de contrôle immunitaires (ICI) représente aujourd'hui une avancé majeur dans le traitement de différents types de cancer, tant sur le plan de l'efficacité que de la tolérance (6). Le nivolumab (nivo) et le pembrolizumab (pembro) sont deux anticorps monoclonaux (AcM) anti-PD-1 qui bloquent l'interaction de PD-1 avec ses ligands. Ces AcM ont montré des résultats prometteurs dans le traitement de multiples types de cancers avancés tout en favorisant des réponses durables chez certains patients (7).

Malgré l'importance thérapeutique de nivo et de pembro dans le cancer, aucune étude à ce jour n'a défini le devenir de PD-1 de surface après la liaison à ces deux AcM, ce qui nous a incité à étudier l'endocytose de PD-1 dans les LT humains. Cette étude est potentiellement importante car les niveaux d'expression du récepteur PD-1 sur les LT et le devenir des complexes PD-1/nivo ou PD-1/pembro pourraient déterminer l'efficacité thérapeutique du nivolumab et du pembrolizumab dans le traitement du cancer.

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# 1. Le PD-1, de la découverte jusqu'au applications cliniques :

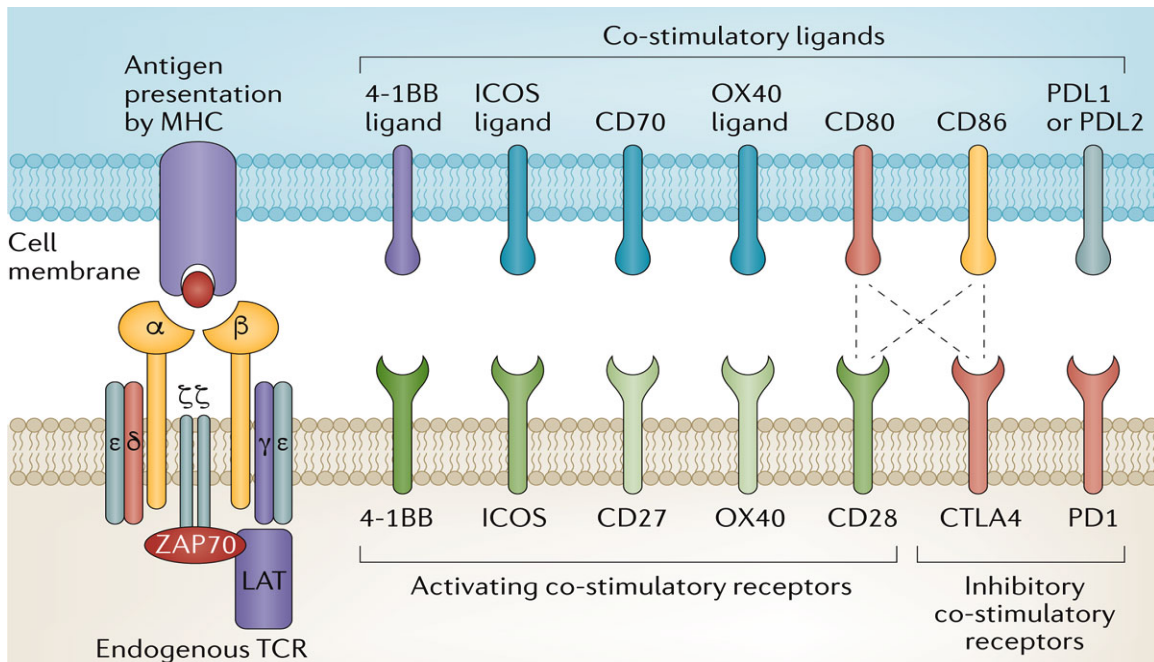
## 1.1.Introduction:

Le système immunitaire a pour but de défendre le corps humain contre une grande diversité d'agents pathogènes. Ce système est divisé en deux grandes composantes : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

Le système immunitaire inné permet d'avoir une réponse rapide contre les pathogènes grâce à différents types de cellules tels que les macrophages, les cellules NK, ou encore les neutrophiles. A contrario, le système immunitaire adaptatif est plus long à se mettre en place mais permet une réponse spécifique aux antigènes grâce aux lymphocytes T (LT) et B (LB), avec génération d'une mémoire immunologique (8, 9).

Bien que le système immunitaire adaptatif représente une protection contre les pathogènes, il peut être aussi une menace pour le soi vu la présence dans la périphérie de certains LT auto-réactifs qui s'échappent de la suppression au cours de la sélection thymique (5, 9). Ceci peut conduire à l'apparition de maladies inflammatoires et auto-immunes. Dans le but d'éviter ces réactions inflammatoires non désirées, le système immunitaire a développé de mécanismes de régulation visant à maintenir l'équilibre entre l'immunité protectrice et la tolérance périphérique.

C'est le mécanisme d'anergie ainsi que de la délétion et la suppression de LT par les cellules T régulatrices (9). Ces effets sont régulés par un système complexe de signaux générés par des récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés à la surface de LT et leurs ligands respectifs (Figure 1) (10). C'est l'équilibre entre ces signaux (activateurs et inhibiteurs) qui permet à ces cellules de réagir de manière appropriée aux antigènes (Ag) tout en évitant l'auto-réactivité (11).

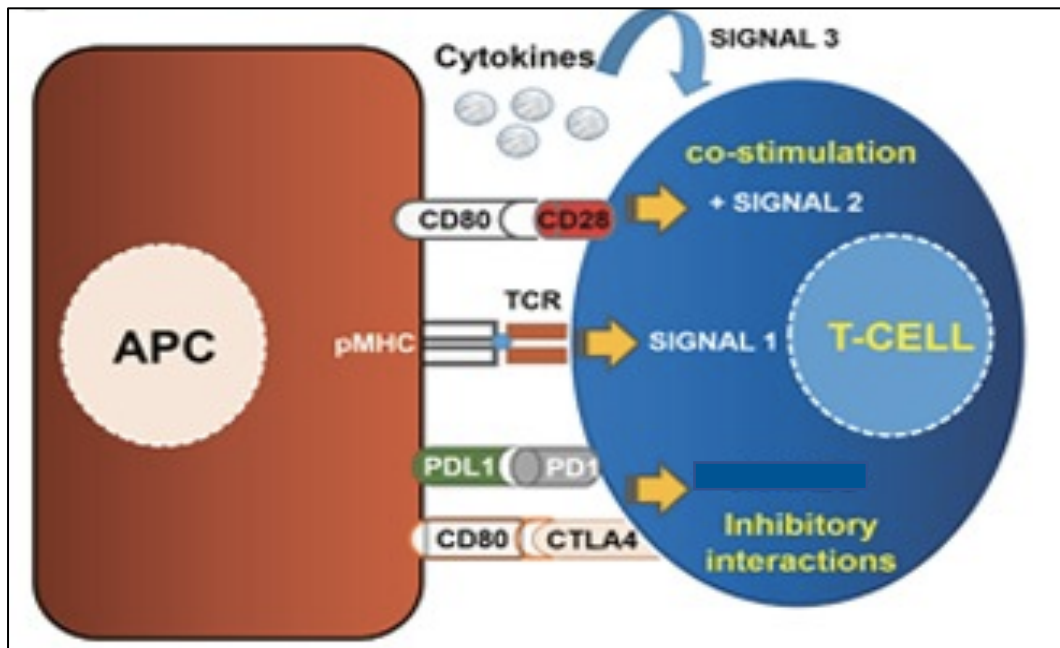


**Figure 1 : Récepteurs activateurs et inhibiteurs à la surface de LT et leurs ligands correspondants à la surface de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (10)**

Ainsi, l'activation et l'expansion des LT se déclenchent par une reconnaissance spécifique entre le récepteur de LT (TCR) et une peptide antigénique lié au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et présentée par une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Cette reconnaissance implique l'étape initiale de l'activation (signal 1). Cependant, les LT ont besoin d'un deuxième signal (signal 2) de co-stimulation pour s'échapper de l'anergie ou de l'apoptose, conduisant ainsi à l'activation optimale des LT. Ce signal provient essentiellement de l'interaction entre le récepteur de co-stimulation CD28 des LT avec ses ligands CD80/CD86 à la surface de CPA. Un troisième signal délivré par les cytokines (signal 3) est aussi nécessaire afin de réguler la différenciation et les fonctions effectrices de LT (Figure 2) (3, 12).

La modulation de la force et de la durée des signaux de stimulation repose, quant à elle, sur des récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface de LT activé (points de contrôle immunitaires) comme le récepteur CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) et le récepteur PD-1 (*programmed cell death protein-1*). Après liaison à ses ligands, PD-L1/PD-L2, le récepteur PD-1 joue un rôle important dans le maintien de la tolérance périphérique tout en protégeant contre les maladies auto-immunes et inflammatoires (2). Cependant, une expression élevée et permanente de PD-1 et de ses

ligands perturbe la prolifération et la fonction effectrice des LT et par conséquent atténuer l'immunité antivirale et anti-tumorale (3, 9).



**Figure 2: Les signaux nécessaires à l'activation optimale de LT (3)**

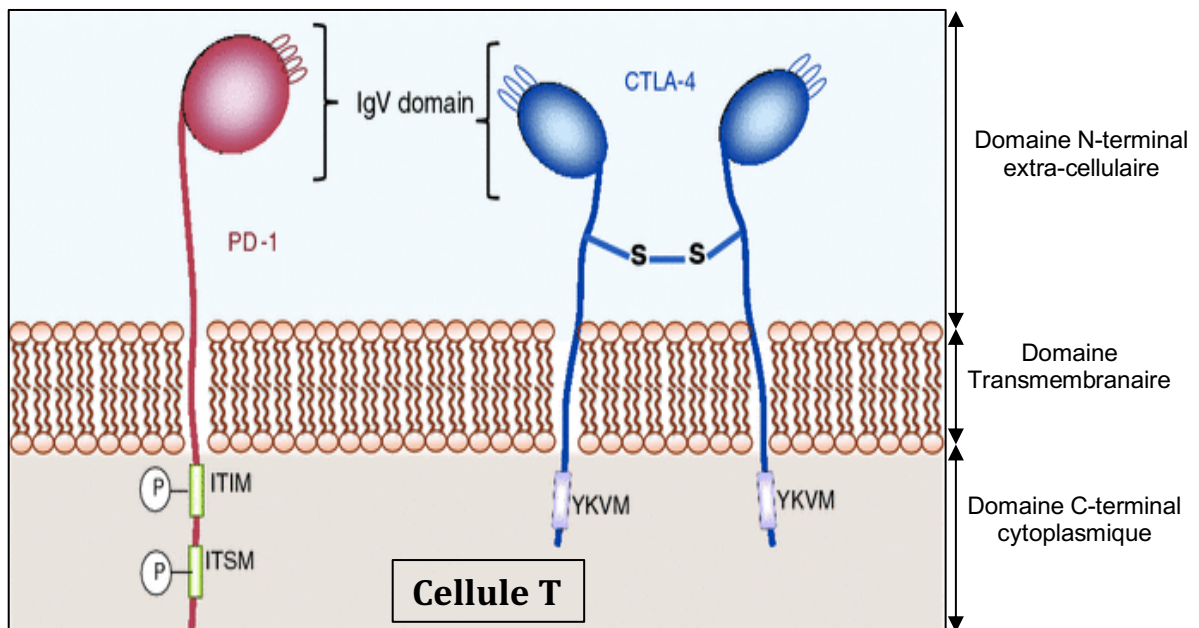
## 1.2. Le récepteur PD-1:

### 1.2.1 Découverte:

Le gène *pdccl1* code pour la protéine PD-1 (*programmed cell death protein -1*) a été identifié en 1992 par l'équipe de Honjo comme étant un gène impliqué dans l'induction de la mort cellulaire programmée. PD-1 a été isolé par hybridations soustractives à partir d'hybridomes T murins (2B4.11) et de cellules progénitrices hématopoïétiques (LyD9) mourants par apoptose (13). Cependant, des expériences ultérieures n'ont pas pu confirmer l'implication directe de PD-1 dans l'apoptose dans ces deux lignées cellulaires. La fonction de PD-1 est restée incertaine jusqu'à ce que le même groupe constate en 1999 que les souris *pdccl1*<sup>-/-</sup> ont développées des maladies auto-immunes sous la forme d'arthrites et de glomérulonéphrites de type lupus (14). Ces observations ont suggéré que PD-1 régulait négativement la réponse immunitaire tout en évitant l'auto-réactivité (15).

### 1.2.2 Structure moléculaire de PD-1:

Le récepteur PD-1 (ou CD279) est une glycoprotéine de 55kDa constituée de 288 acides aminés. Il est composé d'un domaine N-terminal extracellulaire de type immunoglobuline (*IgV-like*), un domaine transmembranaire de 20 acides aminés et un domaine C-terminal cytoplasmique contenant deux motifs de tyrosines : un motif ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) à proximité de la membrane suivi d'un motif ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) (16, 17). Ce second motif sert de base moléculaire à l'ensemble des fonctions inhibitrices de PD-1(3). La comparaison entre la région cytoplasmique de PD-1 humain et murin a montré une homologie de 60% (Riley 2009). Le récepteur PD-1 fait partie de la famille de CD28 qui est caractérisée par sa structure de type immunoglobuline (IgV) et composée de molécules à activités stimulatrices (CD28, ICOS) et inhibitrices (CTLA-4, PD-1, BTLA) (11). Cependant, une comparaison plus approfondie entre PD-1, CD28, ICOS et CTLA-4 révèle de différences fonctionnelles et structurales. En effet, contrairement aux autres membres de la famille de CD28, PD-1 existe sous forme de monomère à la surface de cellule car il ne possède pas de résidu de cystéine responsable de l'homodimérisation de CTLA-4, CD28 et ICOS (15, 16, 18) (Figure 3).



**Figure 3: Structure du PD-1 en comparaison avec celle de CTLA-4 (Figure modifiée de (18))**

### ***1.2.3 Expression et régulation du PD-1 :***

Le gène *pdccl1* codant pour la protéine de PD-1 est situé sur le chromosome 2 humain (2q37) (17). Le récepteur PD-1 est exprimé sur les thymocytes immatures CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> au cours de leur différenciation thymique. L'expression de PD-1 est inductible sur les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les cellules B, les cellules NKT (Natural Killer T) et les monocytes lors de leur activation (Figure 4) (8). PD-1 est induit par l'engagement du TCR (*T cell receptor*) ou du BCR (*B cell receptor*) et aussi par divers cytokines comme les interleukines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21 (9). De plus, l'expression de PD-1 est régulée par plusieurs facteurs de transcription : NFATc1 (*Nuclear factor of activated T cells c1*) est un facteur important qui induit l'expression de PD-1 dans les LT, tout comme les facteurs de transcription FoxO1 et Notch (2). Cependant, le facteur T-bet fonctionne comme répresseur de la transcription de PD-1. Aussi, l'équipe de Rudd a montré pour la première fois que le GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*) est un régulateur central de l'expression de PD-1 dans les LT CD8<sup>+</sup>. En effet, l'inhibition de GSK-3 induit l'expression de T-bet qui à son tour réprime la transcription de PD-1 (19, 20).

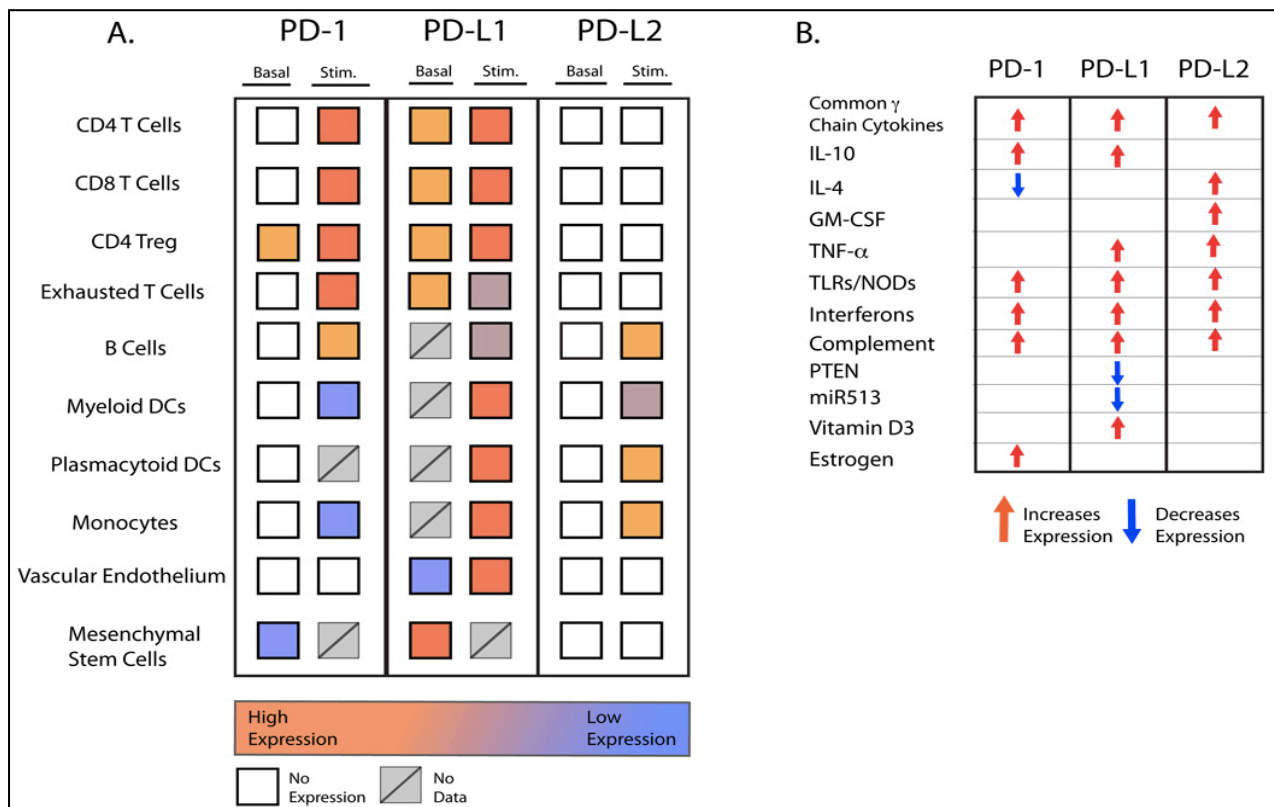
L'expression de PD-1 peut être aussi soumise à des régulations épigénétiques (21) mais des travaux supplémentaires sont nécessaires pour identifier le mécanisme de régulation de PD-1 (2).

### ***1.2.4 Les ligands du PD-1 :***

Les ligands de PD-1, le PD-L1 (également connu sous le nom de B7-H1) et le PD-L2 (B7-DC) ont été identifiés en se basant sur leurs similarités avec les molécules B7 (22-24). Ces ligands sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1 composés de domaines extracellulaires de type IgV et IgC (12,16), ainsi que d'une courte queue cytoplasmique sans aucun motif pour la transduction de signal (8, 15). Bien que l'expression de PD-L2 est limitée dans les CPA activées comme les cellules dendritiques (CD), les macrophages et les mastocytes, le ligand PD-L1 est largement exprimé sur les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. En effet, Le PD-L1 est constitutivement exprimé à la surface des LT, LB, des macrophages, des CD et des mastocytes mais son expression augmente suite à l'activation de ces cellules (25). L'expression constitutive de PD-L1 est plus élevée chez les souris que chez les humains (8). Le PD-L1 est aussi exprimé sur les cellules endothéliales vasculaires, les cellules épithéliales, les cellules des îlots pancréatiques, les neurones et les hépatocytes (8, 25) (Figure 4-A). L'expression de PD-L1 dans

les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes suggère le rôle important de la voie PD-1/PD-L1 dans la régulation de la réponse immunitaire dans les organes lymphoïdes secondaires et aussi dans les organes cibles (15, 18).

L'expression de PD-L1 et PD-L2 est régulée par divers cytokines. En effet, les interleukines (IL) IL-2, IL-7 et IL-15 induisent l'expression de PD-L1 sur les LT humains, alors que l'IL-21 stimule l'expression de PD-L1 à la surface des LB (CD19<sup>+</sup>) provenant de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (9). Le traitement par l'interféron-gamma et l'IL-10 entraîne aussi l'expression de PD-L1 sur les monocytes humains, tandis que l'IL-4 et le facteur GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) stimulent l'expression de PD-L2 sur les CD8 (Figure 4-B)(8, 9).



**Figure 4: Expression relative (A) et régulation du PD-1 et ses ligands (B) (8)**

**Basal : cellules naïves. Stim : cellules activées**



### ***1.2.5 Signalisation du PD-1 dans les lymphocytes T :***

Des études ont montré que le motif cytoplasmique ITSM de PD-1 a un rôle fonctionnel clé dans la médiation immuno-inhibitrice de ce récepteur (26, 27). En effet, l'engagement de PD-1 avec l'un de ses ligands (PD-L1 ou PD-L2) induit la phosphorylation d'un résidu tyrosine dans le domaine ITSM conduisant au recrutement de la tyrosine phosphatase 2 contenant un domaine SH2 (SHP-2). Ce dernier est responsable de la déphosphorylation des molécules de signalisation à proximité du TCR dans la synapse immunologique, comme ZAP-70 (*z*éta-chain associated protein kinase 70). Ainsi, l'activité de la PI-3K (*phosphatidyl-inositol 3 kinase*) induite par CD28 est diminuée, altérant ainsi la voie de signalisation d'AKT. De plus, l'interaction de PD-1 avec son ligand agit sur la voie de signalisation Ras/MEK/Erk tout en l'inhibant. Suite à ces effets, l'activation de facteurs de transcription (ou TFs) comme AP-1 (*activator protein 1*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) et NF-κB (*nuclear factor-κB*) est diminuée (Figure 5). Il en résulte donc une altération dans l'activation, la prolifération et la survie des LT ainsi que dans la production des cytokines et le métabolisme. De plus, PD-1 peut inhiber les fonctions effectrices des LT en augmentant l'expression du facteur de transcription BATF (*basic leucine zipper transcription factor ATF-like*) (2) (figure 5).

Le mécanisme précis de la signalisation du PD-1 n'est pas encore claire. Bien qu'il était connu que l'engagement du PD-1 réduit essentiellement la voie de signalisation du TCR (26, 28), deux études suggèrent que la signalisation de PD-1 inhibe préférentiellement la voie de signalisation médiée par le CD28 plutôt que par la signalisation TCR (29, 30), alors qu'une étude récente a montré encore que PD-1 cible préférentiellement la voie de signalisation du TCR (31).

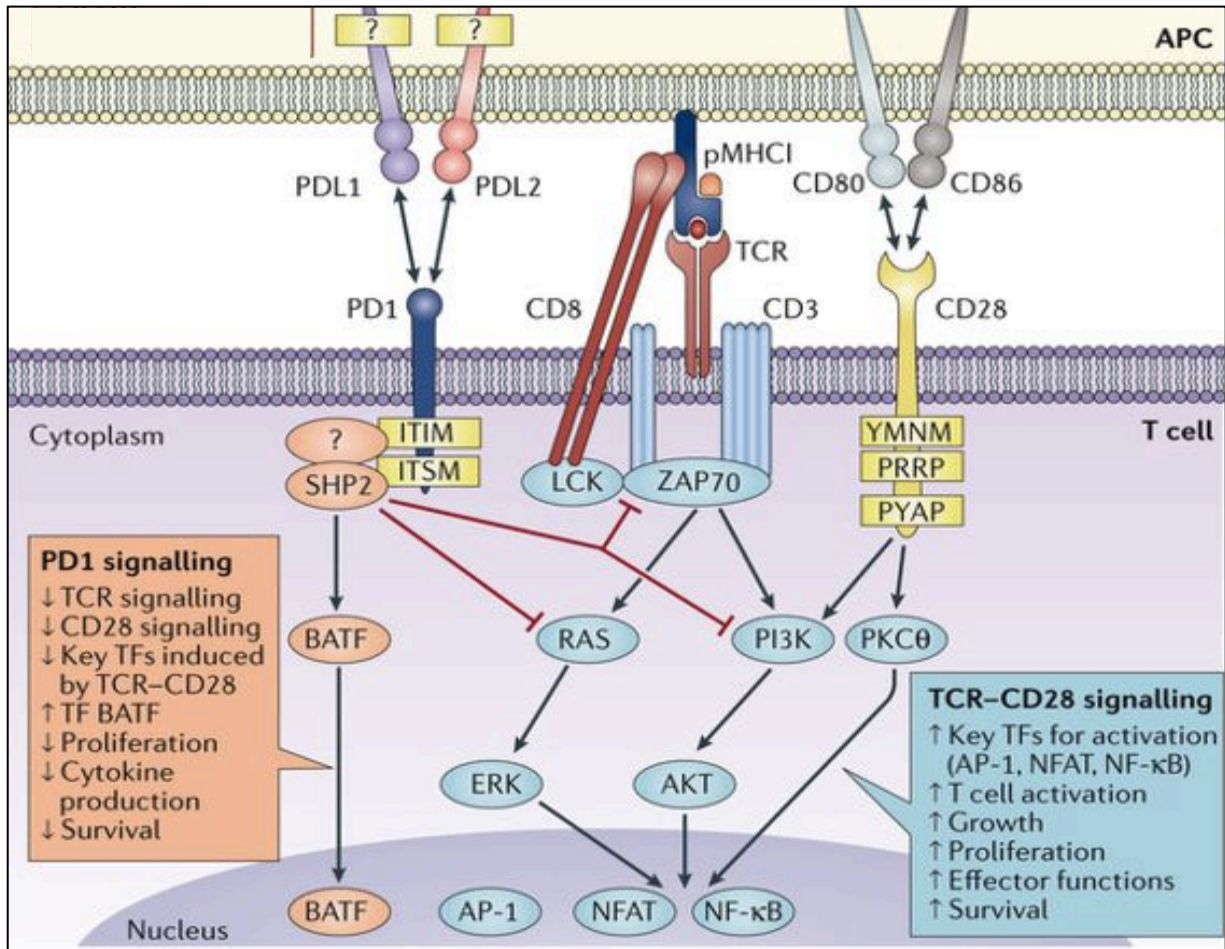


Figure 5: Mécanisme de signalisation du PD-1 dans les LT (Figure modifiée de (2))

### 1.3. Fonctions biologiques de PD-1 :

#### 1.3.1 Rôle de PD-1 dans le maintien de la tolérance de LT :

L'activation de la voie de PD-1 par l'un de ses ligands délivre des signaux inhibiteurs qui régulent la tolérance centrale et périphérique de cellules T.

Dans le thymus, le ligand PD-L1 est exprimé largement sur l'épithélium du cortex thymique et sur les CD, alors que PD-L2 est exprimé sur les CD présentes dans la médulla. PD-1 est exprimé principalement sur les thymocytes double négatifs CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> et son expression est augmenté sur les thymocytes double positives CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> après l'engagement du TCR (8). Les interactions PD-1/PD-L1 limitent la sélection positive des thymocytes au cours de stades de développement

thymique tout en contrôlant le seuil de signalisation du TCR. Ainsi, l'absence de PD-L1 augmente le nombre de thymocytes double positifs CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (32).

PD-1 participe également à la sélection négative (33). Cependant, le mécanisme de régulation de la sélection thymique par la voie PD-1/PD-Ls reste encore mal connu.

En plus de son rôle dans la tolérance centrale, la voie PD-1/PD-Ls contrôle la tolérance périphérique des LT de différentes manières. L'interaction PD-1/PD-Ls limite la phase d'initiation, de l'activation et d'expansion de cellules T autoréactives. Aussi, cette interaction restreint les fonctions effectrices des LT autoréactifs afin de limiter une possible lésion de l'organe cible. De plus, l'expression de ligands PD-L1 et PD-L2 sur les CD<sub>s</sub> tolérogéniques détermine si l'interaction avec les LT mènera à leur activation ou à leur tolérance. Par ailleurs, l'expression de PD-L1 sur les cellules endothéliales ainsi que sur d'autres cellules non hématopoïétiques contribue au maintien de la tolérance. En effet, la présence de PD-L1 sur les cellules endothéliales diminue l'invasion des LT dans l'organe cible. La signalisation par la voie PD-1/PD-Ls régulent également l'interaction dynamique entre les cellules T effectrices (T<sub>eff</sub>) et les cellules T régulatrices (T<sub>reg</sub>). Ces dernières expriment aussi de hauts niveaux de PD-1 et de PD-L1 et jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance périphérique (8) (Figure 6).

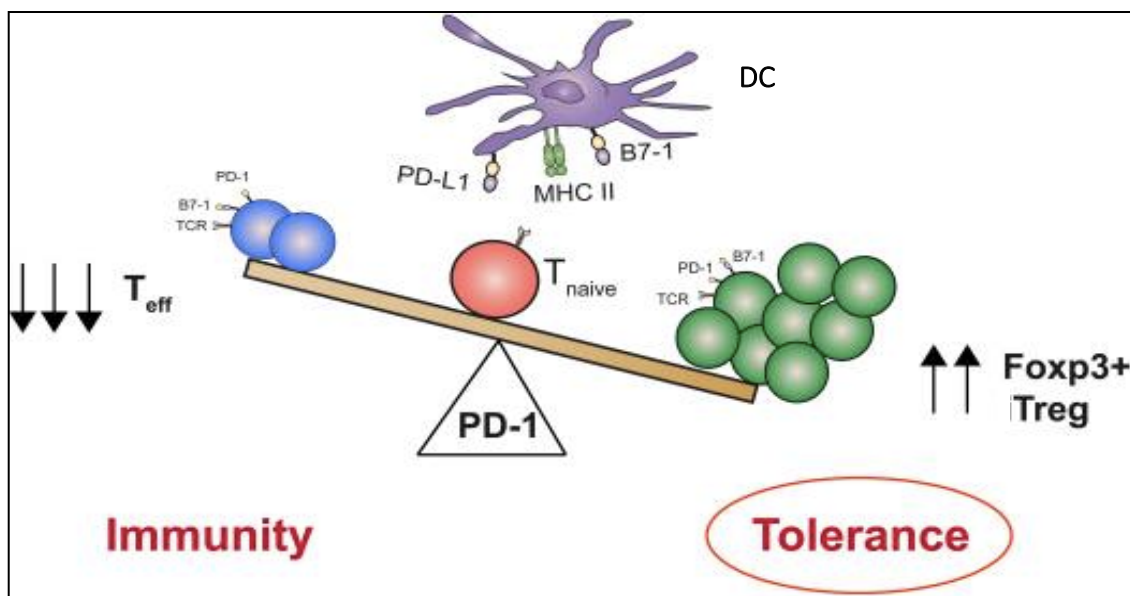


Figure 6: Rôle de PD-1 dans le maintien de la tolérance de cellules T (8)

### **1.3.2 Rôle de PD-1 dans les maladies auto-immunes :**

L'implication du PD-1 dans les maladies auto-immunes a été identifiée pour la première fois en 1999 par Nishimura et al. qui ont montré que les souris *pdccl1*<sup>-/-</sup> déficientes en PD-1 développent des maladies auto-immunes sous la forme de glomérulonéphrite de type lupique et des arthrites destructives (14). De plus, Wang et al. ont montré que l'absence de PD-1 accélère l'apparition précoce du diabète de type I chez un modèle murin NOD (*non-obese diabetic*) (34). Ansari et al ont signalé également que le blocage de PD-1 ou de PD-L1 (mais pas PD-L2) entraîne une aggravation de diabète de type I (35). Ceci est accompagnée d'une augmentation du nombre de LT dans le pancréas ainsi que de la production de cytokines pro-inflammatoires (Figure 7.C)

En plus de modèle murin, l'altération de la voie PD-1/PD-Ls est impliquée aussi dans le développement de maladies auto-immunes chez l'être humain. En effet, des auto-anticorps dirigés contre le PD-L1 ont été trouvés chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR). Les auteurs ont suggéré que les auto-anticorps anti-PD-L1 bloque l'interaction PD-1/PD-L1 ce qui contribue au développement de la maladie de PR via l'activation aberrante de cellules T (36).

En outre, une étude menée par Prokunina et al. a montré qu'il y a une association entre un polymorphisme d'un seul nucléotide (ou SNP) du gène *pdccl1*, connu sous le nom PD1.3A, et le développement du lupus érythémateux systémique (37, 38). Ce SNP est associé aussi avec d'autres maladies auto-immunes comme le diabète de type I, la sclérose multiple progressive et la polyarthrite rhumatoïde (39-41).

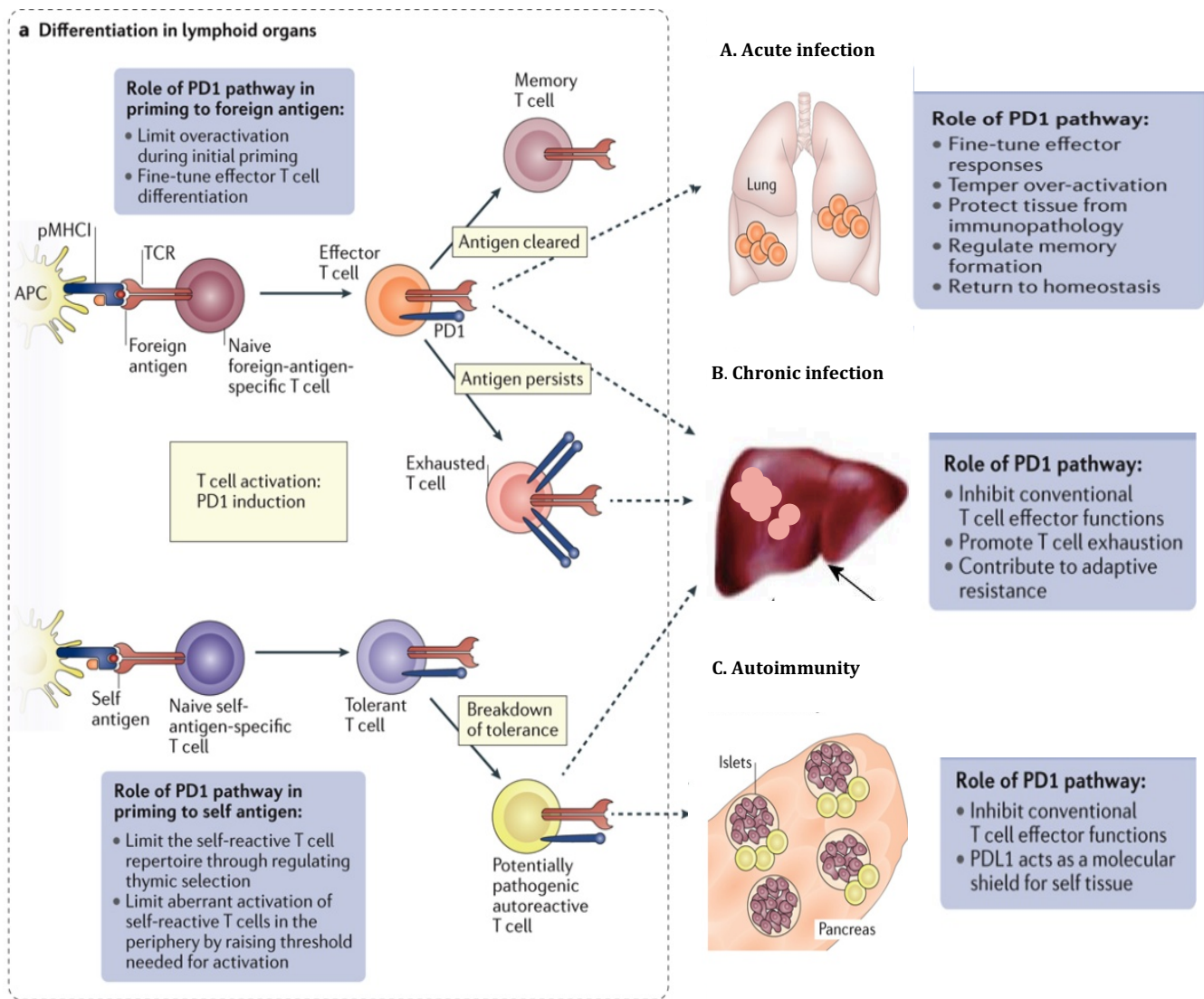
### **1.3.3 Rôle de PD-1 dans les maladies infectieuses :**

Le PD-1 et ses ligands jouent un rôle important dans la régulation des défenses immunitaires contre des pathogènes. Ils gèrent la balance entre l'élimination du pathogène et le contrôle des dommages tissulaire potentiellement causés par la réponse immunitaire. Cependant, différents pathogènes exploitent la voie inhibitrice du PD-1/PD-Ls pour échapper aux LT et ainsi faciliter leur persistance (5). Suite à une infection aigue, les LT antiviraux sont activés grâce à la reconnaissance du complexe CMH/peptide viral présenté par les CPA, ce qui entraîne leur prolifération, la production de cytokines et l'acquisition de leur profil cytotoxique conduisant ainsi à l'élimination du pathogène virale. Dans ce cas, le rôle de PD-1 est de contrôler la fonction effectrice des LT tout en protégeant l'organe cible contre l'inflammation (Figure 7.A)(2).

En revanche, des études réalisées sur des souris ont montré que lors d'une infection virale chronique, il y a dysfonctionnement des LT CD8<sup>+</sup> antiviraux . Cet état de dysfonctionnement se traduit par un épuisement de LT CD8<sup>+</sup> qui perdent leur fonction cytotoxiques et finissent par mort cellulaire (42). De plus, une infection chronique, chez la souris, causée par le virus de la lymphochorioméningite (LCMV, clone 13) conduit à une augmentation de l'expression du PD-1 sur les cellules T CD8<sup>+</sup>. Cette expression reste élevée tout au long de l'infection menant à l'épuisement des LT CD8<sup>+</sup> et à la persistance de virus (43).

Chez l'homme, en cas d'infection par le VIH (virus d'immunodéficience humaine), il existe une corrélation positive entre l'expression élevée du PD-1 sur les cellules T CD4<sup>+</sup> épuisées et la charge virale plasmatique ainsi que la chronicité de l'infection (44).

De plus, au cours de l'infection chronique par le virus de l'hépatite C, une expression élevée du PD-1 a été observée sur les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques dans le sang périphériques et dans le foie des patients (45) (Figure 7.B). Puisque la voie PD-1/PD-Ls est impliquée dans l'épuisement de LT CD8<sup>+</sup> au cours d'infections virales chroniques, l'utilisation d'anticorps bloquant cette voie a montré son efficacité dans la récupération de fonctions de ces cellules (45).

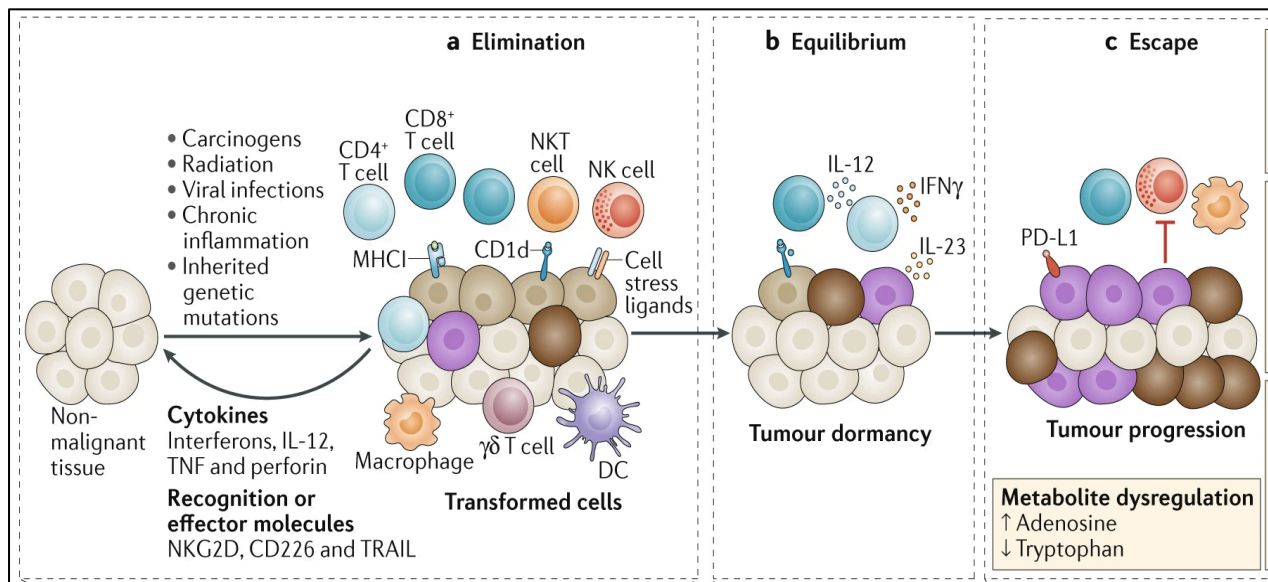


**Figure 7: Rôle de PD-1 dans les infections virales et dans l'auto-immunité (Figure modifiée de (2))**

### 1.3.4 Rôle de PD-1 dans le cancer :

Le système immunitaire joue un rôle double face au cancer : d'une part, il cherche à éliminer les cellules cancéreuses mais d'autre part il façonne l'immunogénicité de la cellule tumorale. Ce concept est appelé immuno-editing (immunosurveillance) et comporte trois phases : élimination, équilibre et échappement (les 3 « E ») (46). Durant la phase d'élimination, le système immunitaire inné et adaptatif détectent les cellules transformées et les éliminent à un stade précoce avant que la tumeur ne se développe et devienne cliniquement apparente (Figure 8.a).

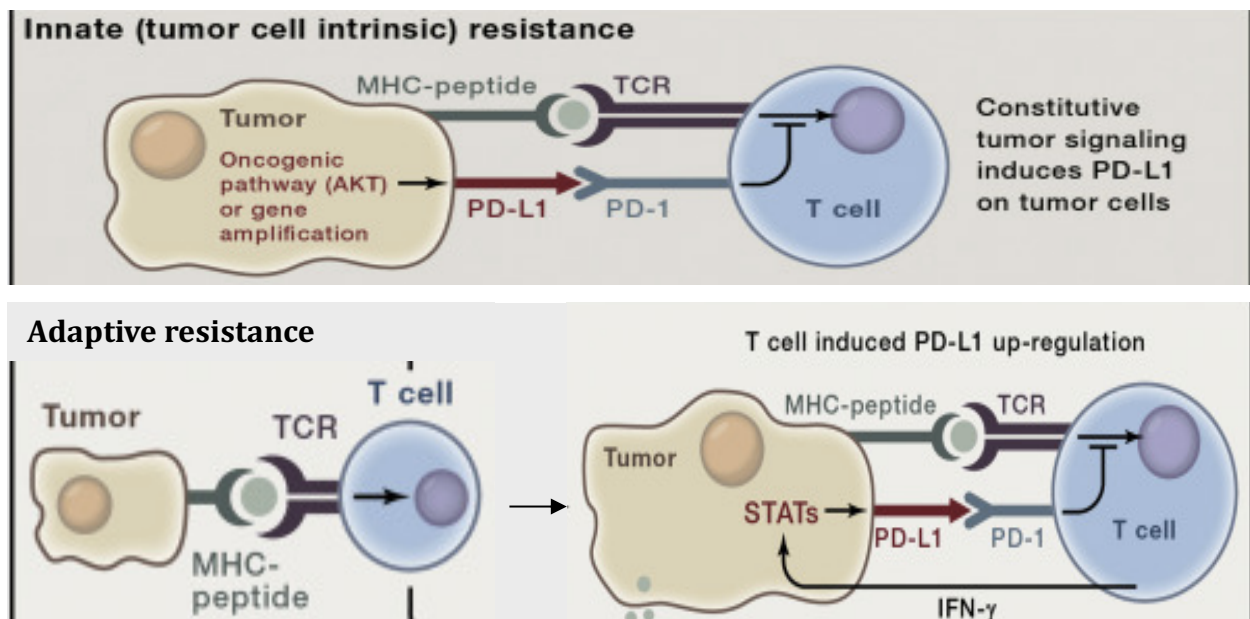
Dans le cas où ces cellules ne sont pas éliminées, elles entrent dans une phase d'équilibre dans laquelle le système immunitaire adaptatif empêche la croissance tumorale tout en façonnant l'immunogénicité des cellules tumorales (Figure 8.b). Il maintient la tumeur dans un état de latence qui peut persister plusieurs années avant qu'elle passe dans la phase d'échappement. Durant cette phase, les cellules tumorales ont acquis la capacité de détourner la reconnaissance et ou la destruction par le système immunitaire. C'est au cours de la phase d'échappement que la tumeur devient cliniquement présente et le système immunitaire ne semble plus jouer de rôle dans le contrôle de sa croissance (Figure 8.c) (46).



**Figure 8: Processus d'immunoediting (Figure modifiée de (46))**

La tumeur détourne le système immunitaire à son profit via différents mécanismes y compris la perte d'expression d'antigène tumoraux ou la perte d'expression du CMH. Aussi, l'échappement peut résulter d'un microenvironnement tumoral spécial caractérisé entre autre par la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) et le recrutement de cellules immunosuppressives comme les cellules T régulatrices (Treg). Par ailleurs, les cellules tumorales sont capables de surexprimer à leur surface les ligands des récepteurs inhibiteurs comme PD-L1/L2 que ce soit de façon innée via l'activation d'une voie de signalisation oncogénique ou de façon induite par les signaux inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  produits lors de la réponse immunitaire dans le microenvironnement tumorale (Figure 9) (47, 48).

L'interaction du PD-L1 avec le PD-1, exprimé sur les LT infiltrant la tumeur, altère la réponse immunitaire anti-tumorale (5). Cette hypothèse a été mise en évidence pour la première fois par Iwai et al. qui ont montré que la surexpression de PD-L1 sur la lignée cellulaire de mastocytome murin inhibe l'activité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> suite à l'engagement de PD-1, ce qui augmente la croissance et l'invasion tumorale (49). Plusieurs études cliniques ont également confirmé que la tumeur exploite la voie de PD-1/PD-L1 pour échapper à la surveillance immunitaire. En effet, PD-L1 est exprimé sur la plupart de tumeurs solides comme le cancer colorectal, rénal pulmonaire, ovarien, pancréatique ou encore le mélanome (5, 50). Parfois, son expression est associée à un facteur pronostic défavorable (5).



**Figure 9: Deux mécanismes pour l'expression de ligand de PD-1 (PD-L1) sur les cellules tumorales (Figure modifiée de (48))**

Une fois activé dans le microenvironnement tumoral, la voie PD-1/PD-L1 altère la prolifération et la survie de LT effecteurs, alors qu'elle induit la génération de LT épuisés et de LT régulateurs (4). Il en résulte une progression et une invasion du cancer. Bloquer la voie PD-1/PD-L1 par des anticorps monoclonaux anti-PD-1 ou anti-PD-L1 inverse donc l'effet de PD-1 sur la signalisation des LT et par la suite accélère l'éradication de la tumeur (4).



## **1.4. Immunothérapie du cancer: Un défi en plusieurs étapes**

### ***1.4.1 Un peu d'histoire :***

Plusieurs immunologistes et même des oncologues rêvent depuis longtemps d'activer le système immunitaire pour obtenir des bienfaits thérapeutiques contre le cancer. Ce concept d'immunothérapie remonte à la fin du XIXe siècle où le docteur William Coley a observé un rétrécissement tumoral chez des patients atteints de sarcomes après injection intratumorale de produits bactériens. Près d'un siècle plus tard, la découverte des CD et leur rôle dans le système immunitaire inné ainsi que l'identification moléculaire des antigènes du cancer ont mené au développement des vaccins par des CD et des vaccins antitumoraux. Par ailleurs, l'importance de l'IFN- $\gamma$  et de l'immunité adaptative dans l'immunosurveillance du cancer ont conduit à la thérapie aux cytokines et à la thérapie adoptive par transfert de LT. Cependant, la plupart de ces traitements a été associée à de nombreux échecs cliniques. Finalement, une des approches prometteuses développée ces dernières années consiste à activer la réponse immunitaire antitumorale en bloquant les points de contrôle immunitaires comme CTLA-4 et l'axe PD-1/PD-L1 (6, 50, 51).

### ***1.4.2 Immunothérapie par inhibition de points de contrôle immunitaires (ICI):***

Le blocage des points de contrôle immunitaires (ICI) par des anticorps monoclonaux ciblant le CTLA-4 et l'axe PD-1/PD-L1 représente aujourd'hui une avancée majeure dans le traitement de plusieurs types de cancer (52). Bien que les traitements conventionnels comme la chimiothérapie et la thérapie ciblée agissent directement sur les cellules cancéreuses, les ICI activent la réponse immunitaire anti-tumorale en perturbant la signalisation de récepteurs co-inhibiteurs de LT (6). En effet, des essais cliniques ont montré que l'administration des anticorps dirigés contre CTLA-4 ou contre PD-1 ou son ligand permet de rétablir les capacités fonctionnelles des LT épuisés, entraînant ainsi des bénéfices cliniques spectaculaires. Par ailleurs, des réponses durables via l'induction d'une mémoire immunologique de longue durée (contre des antigènes tumoraux) ont été observées chez plusieurs patients traités par ICI (52).

#### ***a. Anticorps anti-CTLA-4 :***

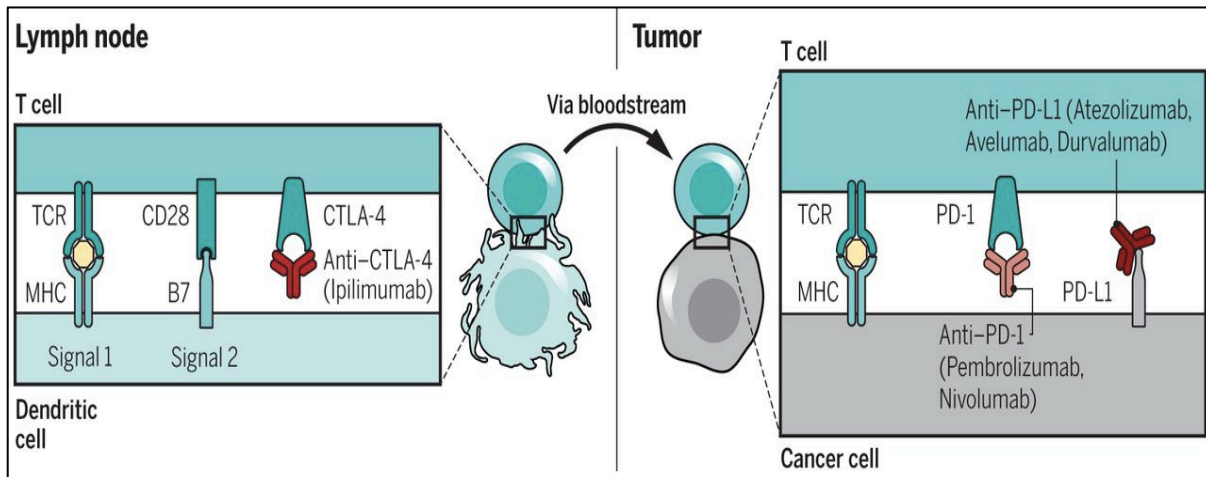
CTLA-4 est un récepteur co-inhibiteur exprimé à la surface de LT conventionnels activés. Une fois lié à son ligand exprimé entre autre sur les CD, le CTLA-4 inhibe l'activation précoce de LT tout en empêchant la formation de LT effecteurs anti-tumorale (53). Le blocage de CTLA-4 dans des modèles murins entraîne une activation de la réponse antitumorale endogène, ce qui a été à l'origine du développement des Ac anti-CTLA-4 (Ipilimumab) dans des essais thérapeutiques (54). Aussi, la voie de CTLA-4 est également importante dans les fonctions de cellules T reg et donc le blocage de cette voie par des anti-CTLA-4 induit la déplétion de ces cellules (55).

L'ipilimumab est un Ac monoclonal humanisé IgG1 qui bloque l'interaction de CTLA-4 avec ses ligands CD80 et CD86 . C'est le premier ICI qui a été approuvé par le FDA (Food and Drug Administration) en 2011 sur la base de deux essais clinique de phase III qui ont démontré une amélioration de la survie globale chez les patients atteints de mélanomes métastatiques (56). Ipilimumab a également montré certains bénéfices dans d'autres types de cancers comme le cancer de reins, cancer du poumon non à petite cellules et le cancer de la prostate (47).

#### ***b. Anticorps anti-PD-1 :***

Contrairement aux Ac anti-CTLA-4 qui agissent au cours de la phase initiale d'activation de LT, les Ac anti-PD-1 agissent pendant la phase effectrice de LT dans les tissus périphériques (Figure 10) (7) . Ces anticorps bloquent l'interaction de PD-1, exprimé à la surface de LT, avec leur ligand PD-L1/PD-L2 présentés à la surface des cellules tumorales. Le blocage de la voie de PD-1 lève l'anergie et améliore la fonctionnalité de LT effecteurs dans le microenvironnement tumoral et par la suite accélère l'éradication du tumeur (7).

En se basant sur plusieurs essais cliniques, le blocage thérapeutique de la voie PD-1 est l'une des avancées les plus importantes dans l'histoire du traitement du cancer. Il a montré de taux de réponse durables chez des patients atteints de plusieurs types de cancer (tel que cancer du poumon, cancer du rein, mélanome, etc) avec un minimum de toxicité en comparaison avec l'ipilimumab (anti-CTLA-4) (7, 47). Le nivolumab et le pembrolizumab sont actuellement les deux anticorps anti-PD-1 les plus prometteurs dans le traitement de différents types de cancer solides et hématologiques (47).

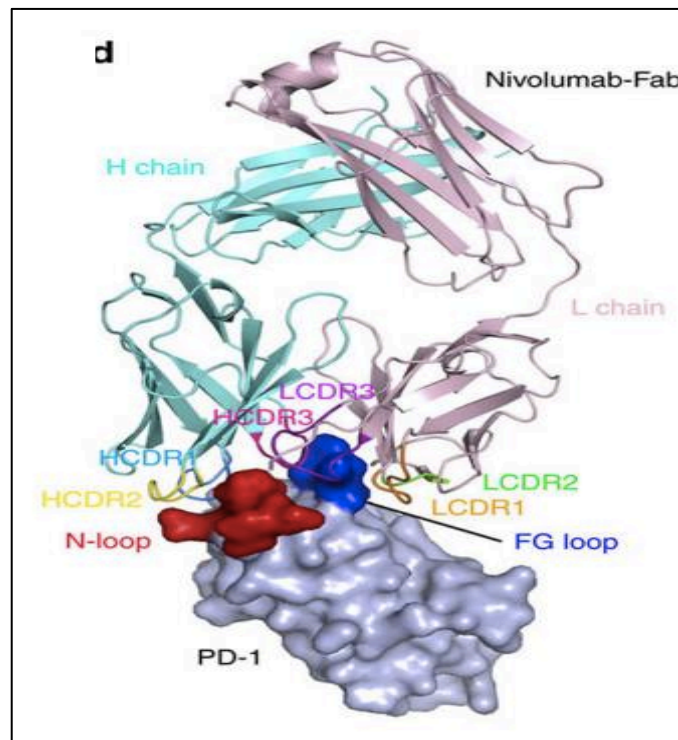


**Figure 10: Blocage de CTLA-4 et de la voie PD-1/PD-L1 par des anticorps monoclonaux afin d'induire la réponse antitumorale de LT (7)**

❖ **Le nivolumab (nivo):**

- Le nivolumab est un anticorps monoclonal entièrement humain contre le PD-1. Il a été développé en utilisant des souris transgéniques portant des loci codant pour des immunoglobulines (Ig) humaines (57). Le nivolumab est d'isotype IgG4 ce qui minimise l'activité cytotoxique du complément ou la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) et par la suite empêche la déplétion de LT activés (58, 59).
- Une étude portant sur la caractérisation de nivo in vitro (60) a montré que cet AcM se lie au PD-1 avec une forte affinité ( $K_d=2,6$  nmol/L) et spécificité. Aussi, il inhibe efficacement l'interaction de PD-1 avec ses ligands PD-L1 et PD-L2. Dans cette même étude, des essais in vitro (réaction lymphocytaire mixte et stimulation avec superantigènes ou cytomégalovirus) ont démontré que le nivo améliore la réponse immunitaire de LT et la production de cytokines. Aucune cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) ou dépendante du complément n'a été observée in vitro lors de l'utilisation de nivo avec les LT activés (60).
- L'analyse cristallographique de l'ectodomaine de PD-1 humain (hPD-1) en complexe avec le fragment Fab (*fragment antigen binding*) de nivo a révélé 3 sites: Le site I englobe la boucle N de PD-1 avec les régions hypervariables ou *complementary determining region* (CDR) H1 et H2 de Fab de nivo.

- Le site II fait intervenir la boucle FG de PD-1 avec les CDR(s) H3 et L2 de nivo. Le site III implique la boucle BC de PD-1 et le CDR H1 de nivo, (Les boucles FG et BC appartiennent au domaine IgV de PD-1). En effet, l'analyse de structure a révélé que la boucle N de PD-1 contribue à la majorité des liaisons hydrogène (10 sur 16) dans l'interface nivolumab et PD-1. Plus précisément, les acides aminés de la boucle N forment 10 liaisons hydrogène avec celles des CDR(s) H1 et H2 du nivolumab. La boucle FG de PD-1 forme également cinq liaisons hydrogène avec les CDR(s) H3 et L2, alors que la boucle BC de PD-1 forme une interaction de liaison hydrogène avec le CDR H. Ensemble, les trois boucles fournissent une plate-forme flexible pour la fixation du nivolumab. Il est à noter que la boucle N, plutôt que le domaine IgV de PD-1, domine l'interaction avec le nivolumab (61)(Figure 11). La superposition structurale du complexe PD-1/Fab de nivo et du complexe PD-1/PD-L1 révèle que le Fab de Nivo et le hPD-L1 interagissent avec le hPD-1 à des régions qui se chevauchent, situées principalement dans la boucle FG, ce qui suggère un mécanisme par lequel le nivo empêche la liaison du PD-L1 au PD-1 (62).



**Figure 11: Structure cristallographique de l'ectodomaine de PD-1 en complexe avec le fragment Fab de nivo (61)**

- Sur le plan clinique, le nivolumab a été administré pour la première fois à un patient en 2006 aux états unis, c'est le premier cas de blocage du PD-1 chez l'humain (6). Dans une grande étude de phase I, Topalian et al ont utilisé le nivolumab chez 296 patients avec des tumeurs solides avancées (63). Les résultats ont montré qu'une réponse objective (partielle ou complète) a été trouvée chez 28% atteints de mélanome, chez 27% des patients avec carcinome à cellules rénales (CCR) et chez 18% des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Les réponses objectives ont été durables (> 6mois) et la majorité des patients répondeurs sont restés en rémission à 2 ans. Le nivolumab a été bien toléré, seulement 14% des patients ont présenté des toxicités de grade 3 et 4. En comparaison avec ipilimumab, le nivo est moins toxique. Ces résultats prometteurs obtenus avec le nivolumab en phase I ont mené à d'autres essais clinique de phase III qui ont démontré l'efficacité de Nivo dans les mélanomes métastatiques (64), le CCR avancé (65), le CPNPC (66), le carcinome urothélial (67) et le carcinome hépatocellulaire (68). Dans le cancer ovarien, les premiers essais cliniques utilisant Nivo comme monothérapie ont démontré une certaine activité antitumorale durable et un profil de toxicité acceptable (69). Le nivolumab a été approuvé par le FDA pour le traitement de mélanome métastatique en 2014, pour le CBNPC en 2015, pour le lymphome de Hodgkin et le CCR en 2016 et pour le carcinome urothélial en 2017. Une des dernières approbations pour le nivo a été fin 2017 pour le traitement de carcinome hépatocellulaire avancé (70).

#### ❖ **Le pembrolizumab (pembro):**

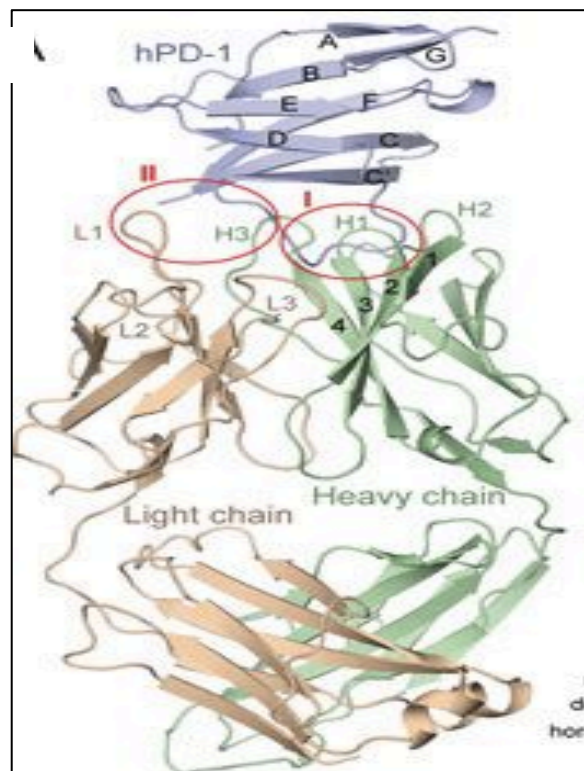
Les données cliniques encourageantes de nivolumab ont mené au développement d'un autre anticorps anti-PD1, le pembrolizumab qui est aussi un anticorps monoclonal humanisé d'isotype IgG4. Tout comme le nivo, le pembro bloque l'interaction de PD-1, exprimé à la surface des LT infiltrant la tumeur, avec leur ligands PD-L1/PD-L2, exprimé à la surface de cellules tumorales. Ce blocage d'interaction active la réponse anti-tumorale de LT afin de s'attaquer aux cellules cancéreuses.

- L'analyse cristallographique de fragment Fab de pembro en complexe avec le PD-1 humain (hPD-1) a permis d'identifier deux sites: Le site I englobe la boucle C'D de hPD-1 avec les CDRs L1, L3, H2 et les quatre brins  $\beta$  de la région charpente ou framework (FR) de Fab de pembro.

Le site II quant à lui, est dominé par des interactions hydrophiles et rassemble les résidus dans les brins C, C' et F de hPD-1 et les CDR L1 et H3 de Fab de pembro (71, 72).

Suite à ces sites d'interaction, pembro se lie au hPD-1 avec une forte affinité avec une constante de dissociation apparente ( $K_d$ ) de 27pM, la boucle C'D de site I contribue principalement à l'efficacité de liaison du pembro (71) (Figure 12).

La superposition structurale du complexe hPD-1/ Fab-pembro et du complexe hPD-1/hPD-L1 montre que le Fab de pembro et le hPD-L1 interagissent avec le hPD-1 par des régions qui se chevauchent, situées principalement dans le site II. Cette observation confirme que la liaison de pembro bloque l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 (71). Le même mécanisme a été observé avec le PD-L2 (71).



**Figure 12: Structure cristallographique de l'ectodomaine de PD-1 en complexe avec le fragment pembro (71)**

- Sur le plan clinique, l'efficacité de pembro a été évalué dans différents types de cancers. En effet, dans le mélanome avancé, des essais cliniques de phase I, II et III ont montré que le pembro a amélioré significativement la réponse globale et le taux de survie des patients par

rapport à l'ipilimumab ou à la chimiothérapie, avec un minimum de toxicité (73). Une autre étude de phase I menée sur des patients atteints de CBNPC et traités par pembrolizumab a montré un taux de réponse de 41% obtenus chez des malades présentant un CBNPC étendu avec surexpression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales (74).

Ces résultats ont été confirmés par l'essai clinique de phase II/III qui a comparé le pembrolizumab au docetaxel (un chimiothérapeutique) dans le CBNPC avancé. Cet essai a montré que pembrolizumab a prolongé la survie globale en particulier chez les patients présentant une forte expression de PD-L1 (> 50%) et que sa toxicité a été tolérable par rapport au traitement par chimiothérapie (75). Ces résultats ont mené à l'approbation du pembrolizumab par le FDA comme monothérapie de première ligne dans le cas de CBNPC avancé avec une forte expression tumorale du PD-L1 ( $\geq 50\%$ ) (76). Le pembrolizumab a également été approuvé par le FDA pour le traitement de carcinome urothélial comme une monothérapie de première ligne (77) et pour le traitement de lymphome de Hodgkin (78). En septembre 2017, le pembrolizumab a obtenu sa dernière autorisation de mise sur le marché pour les patients atteints de cancer gastrique avancé et dont les tumeurs expriment le PD-L1 (79).

### **1.5. Perspectives cliniques et voies de recherche :**

Sur le plan clinique, le traitement par des anticorps anti-PD1 a montré des résultats prometteurs dans différents types de cancer tant sur le plan de l'efficacité que de la tolérance. Ces avancées thérapeutiques résultent du fait que l'objectif est d'activer le système immunitaire contre les cellules tumorales et aussi de tenir compte du microenvironnement immunosuppresseur induit par la tumeur. Cependant, ces anticorps ne bénéficient pas à tous les patients traités (80).

Afin d'augmenter le taux de réponse, des essais cliniques ont évalué la combinaison des Ac anti-PD-1 (nivo ou pembrolizumab) et anti-CTLA-4 (ipilimumab) dans différents types de cancer. Cette combinaison a entraîné des réponses cliniques améliorées par comparaison à l'utilisation de ces Ac en monothérapie, mais au prix d'une toxicité plus importante.

D'autres anticorps ciblant différentes molécules co-inhibitrices (comme LAG3, TIM3, TIGIT, VISTA) et co-stimulatrices (ICOS, 4-1BB, OX40, CD40) de LT font actuellement l'objet d'études précliniques et cliniques afin d'évaluer leur potentiels thérapeutiques (80).

Par ailleurs, la liaison des anticorps aux récepteurs membranaires comme cibles peut avoir de nombreux effets : Elle peut neutraliser directement l'interaction récepteur/ ligand, mais elle peut

aussi induire l'internalisation du récepteur à partir de la surface cellulaire. Les ICI, comme les anticorps anti-PD-1 sont connus de bloquer l'interaction de PD-1 avec ses ligands PD-L1 et PD-L2, mais la possibilité d'induire l'endocytose de récepteur PD-1 n'est pas encore déterminée. L'identification de ce mécanisme pourrait ouvrir des autres voies de recherches visant à améliorer l'efficacité thérapeutique des ICI.

## 2. Endocytose :

L'endocytose est un processus cellulaire qui implique la formation de vésicules ou tubules membranaires afin de permettre à la cellule d'internaliser diverses molécules voire de particules de la membrane plasmique vers le cytoplasme (81, 82).

Le terme "endocytose" englobe différents mécanismes dont la macropinocytose, la phagocytose et la micropinocytose (83) (Figure 13).

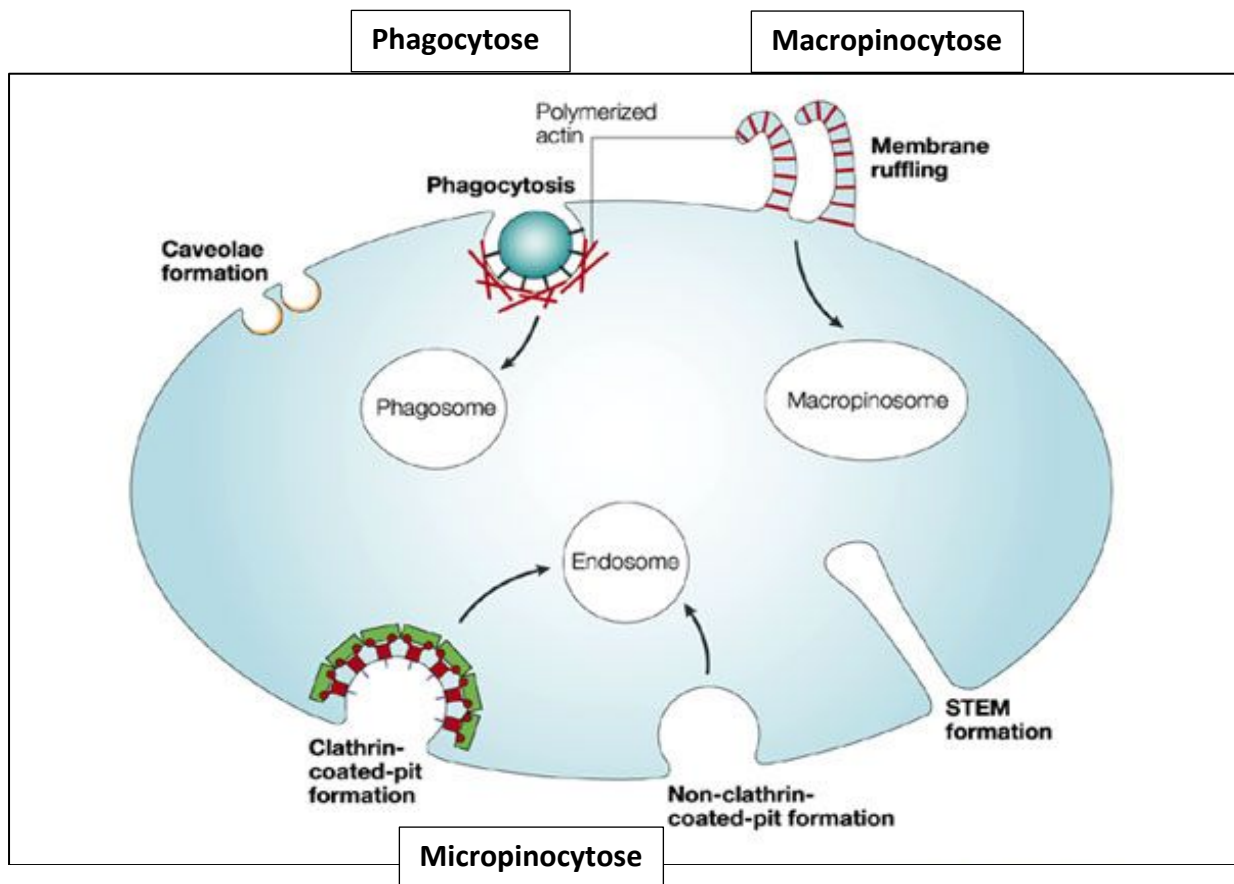
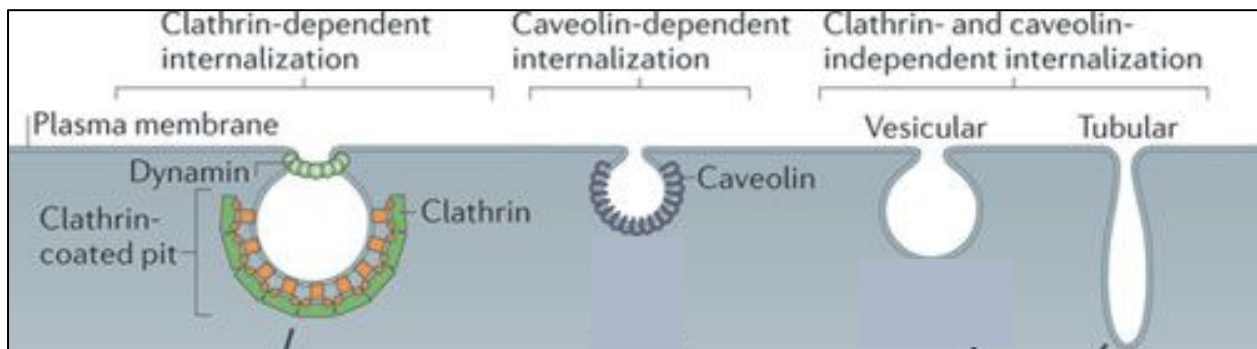


Figure 13: Les mécanismes d'endocytose (macropinocytose, phagocytose et micropinocytose) (Figure modifiée de (83))



La macropinocytose fait généralement référence à l'absorption non spécifique de liquide extracellulaire. La phagocytose est un processus par lequel une cellule spécialisée (macrophage) engloutie des particules relativement grandes ayant plus de 0,3 micromètre de diamètre (83). La micropinocytose, ou endocytose à récepteur, implique la formation de vésicules de petit diamètre (50-120nm) contenant habituellement des ligands extracellulaires liés à leur récepteurs cellulaires (81).

L'endocytose à récepteur peut être effectué soit par voie dépendante de la clathrine, soit par voie dépendante de la cavéoline, soit par voie agissant indépendamment de la clathrine et de la cavéoline (Figure 14) (84). Dans cette section, seul l'endocytose par vésicules de clathrine sera bien détaillée.



**Figure 14: Les voies d'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine (Figure modifiée de (84))**

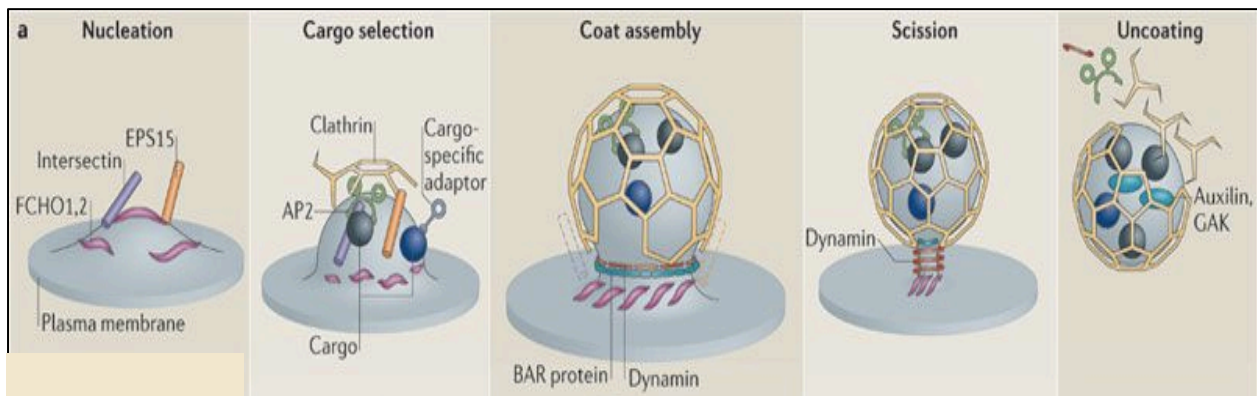
## **2.1 Endocytose dépendante de vésicules de clathrine (EDC) :**

L'endocytose médiée par les vésicules de clathrine est la principale voie d'internalisation des récepteurs dans les cellules de mammifères. Ce mécanisme fait l'objet de nombreux études depuis plus de 40 ans (85) En effet, le récepteur de transferrine (*TFR*), le récepteur des lipoprotéines à faible densité (*LDLR*) et le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (*EGFR*) sont les récepteurs les plus utilisés pour l'étude de cette voie d'endocytose (86, 87). Les récepteurs internalisés par EDC sont classés en deux groupes : certains comme celui de *TFR* ou le *LDLR* le sont de façon constitutive c'est à dire indépendamment de la liaison de leur ligand, et se ré-insèrent dans la membrane plasmique, alors que d'autres, principalement les *EGFR*, ne sont internalisés qu'après la liaison de leur ligand et sont dégradés dans les lysosomes (84).

L'endocytose dépendante de clathrine a tiré son nom d'un composant clé dans la machinerie d'internalisation, la protéine de clathrine. Cette protéine représente le constituant majeur des structures membranaires spécialisés, les puits recouverts de clathrine (*Clathrin-coated pits, CCP*). Les CCP concentrent les récepteurs transmembranaires en cours d'internalisation et s'invaginent jusqu'à l'obtention d'une vésicule de clathrine (*clathrin coated vesicles, CCV*). Cette vésicule se détache de la membrane plasmique et pénètre dans le cytoplasme où elle se débarrasse de son manteau protéique (*uncoating*) avant de fusionner avec les endosomes précoces. Les récepteurs endocytés vont ensuite recycler vers la membrane plasmique ou envoyer vers les lysosomes pour la dégradation (81, 84).

### 2.1.1 La formation de vésicules recouvertes de clathrine (CCV) :

La formation de CCV se fait en cinq étapes bien caractérisées : 1) l'initiation ou la nucléation, 2) la sélection de cargo (protéines de la membrane vésiculaire ainsi que les récepteurs et leur ligands), 3) l'assemblage du manteau de clathrine, 4) la scission de la vésicule et 5) la dissociation de manteau de clathrine (*uncoating*) (Figure 15)(84).



**Figure 15: Les cinq étapes de formation d'une vésicule de clathrine (Figure modifiée de (84))**

#### a- La nucléation :

Cette étape est initiée par la liaison préalable des protéines FCHO (*FCH domain only*), EPS15 (*EGFR pathway substrate 15*) et de l'intersectine dans les régions riches en phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) de la membrane plasmique (88) (figure 15.a). Cette liaison

entraîne l'établissement d'un module de nucléation qui définit le lieu de formation de CCV. De plus, elle est nécessaire au recrutement de la protéine adaptatrice, AP-2 (84).

#### ***b- La sélection de cargo :***

Une fois recruté dans la membrane plasmique, l'AP-2, avec d'autres protéines adaptateurs spécifiques sont impliqués dans la sélection de cargo (formé essentiellement des récepteurs et leurs ligands). La protéine adaptatrice AP-2 est constituée de quatre sous unités : deux de haut poids moléculaire ( $\alpha$  et  $\beta$ -adaptines) et deux plus petites ( $\mu$ 2 et  $\delta$ 2). Chacun de ces sous domaines est impliqué dans les interactions avec d'autres protéines de la voie d'endocytose (89).

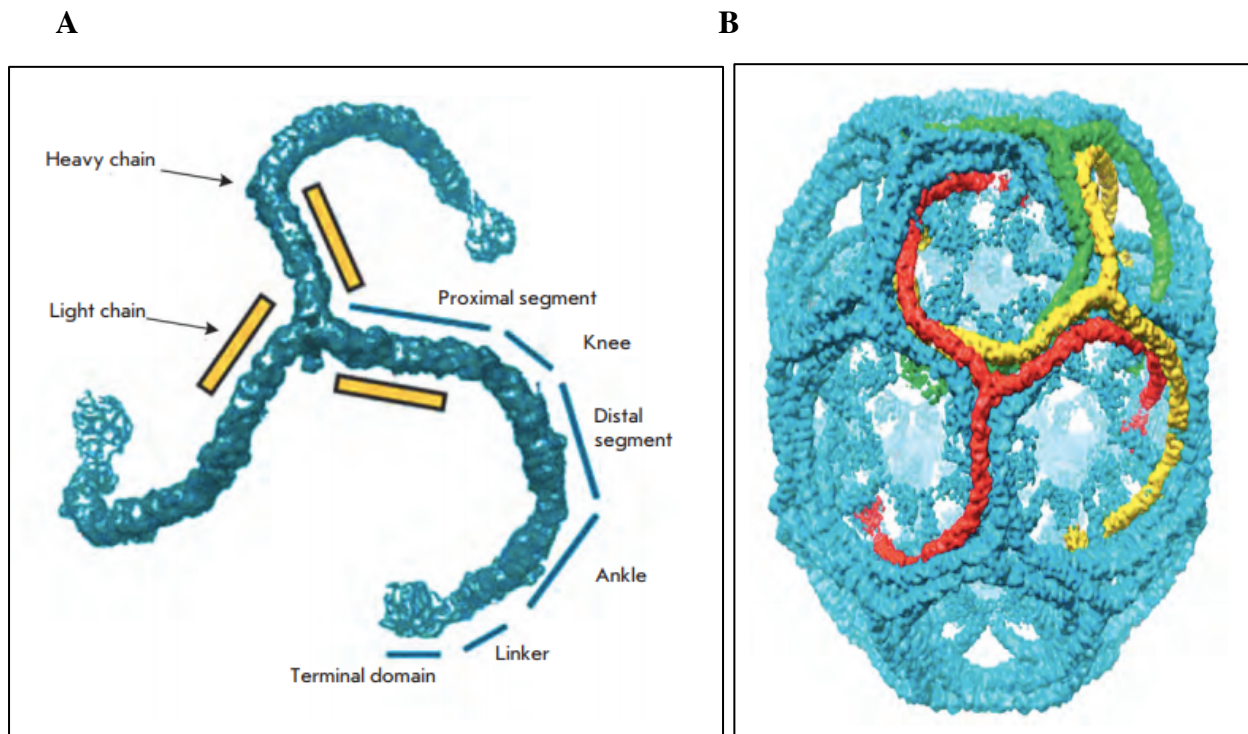
La protéine adaptatrice AP-2 recrute plusieurs classes de récepteurs par l'intermédiaire de ses deux sous unités  $\mu$  et  $\delta$  qui interagissent directement avec des motifs présents sur la queue cytoplasmique de récepteurs membranaires (84). En outre, AP-2 interagit indirectement avec le cargo; elle recrute des protéines adaptatrices secondaires qui interviennent dans la sélection de cargo. C'est le cas des récepteurs couplés aux protéines G qui utilisent les  $\beta$ -arrestines comme adaptateurs spécifiques (90).

La liaison d'AP-2 au PI(4,5)P2 de la membrane plasmique et au cargo est associé à un changement de conformation d'AP-2. Ce changement révèle le site de liaison de la clathrine et permet au protéine d'AP-2 de recruter la clathrine pour la formation de CCP (81).

#### ***c- Assemblage de manteau de clathrine :***

La clathrine est la protéine structurale majeure du manteau. Elle est constituée de trois chaînes lourdes associées par leurs domaine C-terminal, chacune d'elles est associé à une chaîne légère. Cet assemblage est appelé « triskèle » (Figure 16) (91). Les triskèles de clathrine sont recrutés par l'AP-2 ainsi que par d'autres protéines adaptatrices (comme AP180), du cytosol aux sites concentrés en adaptateurs. Son recrutement lui permet de se polymériser en hexagones et en pentagones pour finalement former un polyèdre en forme de cage appelé manteau de clathrine autour de la vésicule en devenir (81). Bien que cette structure est essentielle pour créer et stabiliser l'invagination de la membrane plasmique, d'autres protéines effectrices de la courbature comme EPS15 et epsin sont nécessaires pour une meilleur invagination de cette membrane (81, 84).

En plus de manteau de clathrine, la cytosquelette d'actine peut également contribuer à la courbature de la membrane au cours de la formation de CCV (92).



**Figure 16: Organisation structurale du triskèle de clathrine (A) et structure de la cage de clathrine obtenue par microscopie cryo-électronique (B) (91).**

*d- La scission de la vésicule :*

Une fois la vésicule recouverte de clathrine (CCV) est formé, son détachement est dépendant d'une enzyme mécano-chimique, la dynamine. La dynamine est une grosse protéine qui possède une activité GTPasique et constituée de plusieurs domaines :

- Un domaine GTPase du côté N-terminal,
- Un domaine GED (*GTPase effector domain*) du côté C-terminal qui est impliqué dans la polymérisation et l'auto-assemblage de la dynamine et
- Un domaine riche en proline qui permet à la dynamine de se lier avec d'autres protéines comme l'amphysine et l'endophiline (Hinshaw, 2000).

La dynamine est recruté au point d'étranglement de la vésicule (*vesicle neck*) par l'intermédiaire de protéines contenant le domaine BAR, comme l'amphysine et l'endophiline, qui ont une interaction préférentielle avec cette région. Ensuite, la dynamine se polymérise autour du col de la vésicule de clathrine et forme une structure en forme de bague. Son activité GTPasique induit le détachement de la vésicule de clathrine de la membrane plasmique suite à l'hydrolyse de GTP(93).

***e- Dissociation du manteau de clathrine (uncoating):***

Suivant le détachement de la vésicule de clathrine, le manteau de clathrine ainsi que les protéines adaptatrices vont se dissocier de la vésicule. Ce processus est effectué par l'intermédiaire de plusieurs molécules comme le HSC70 (*Heat shock cognate 70*) et son co-facteur, l'auxiline. En effet, l'auxiline se lie aux domaines terminaux de la triskèle de clathrine et induit le recrutement de HSC70 qui, par son activité ATPase, dissocie le manteau de clathrine de la CCV. Une autre molécule, appelé synaptojanine, est également nécessaire durant ce processus. La synaptojanine est une polyphosphoinositide phosphatase qui déphosphoryle les phosphoinositides phosphates (PIPs) des vésicules de clathrine et par la suite faciliter le détachement des protéines adaptatrices et de manteau de clathrine (81). Les protéines de clathrine ainsi que les molécules adaptatrices, libérés dans le cytoplasme, vont être recyclés alors que la vésicule endocyttaire formée va fusionner avec les compartiments endosomiales.

***2.1.2 Destination de la vésicule d'endocytose :***

Après le détachement de manteau de clathrine et les protéines adaptatrices, la vésicule d'endocytose, englobant le cargo (constitué principalement des récepteurs et de leurs ligands), fusionne avec les endosomes précoces. Les protéines cargo internalisés sont ensuite triées vers les endosomes de recyclage où ils vont recycler vers la membrane plasmique, ou envoyées vers les endosomes tardifs. Ces derniers peuvent devenir des lysosomes qui dégradent les protéines cargo par l'intermédiaire des protéases (83, 94).

## 2.2 Endocytose des récepteurs à tyrosine kinase :

L'internalisation des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) se fait essentiellement par voie dépendante de clathrine chez les cellules de mammifères. Parmi les RTK, le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (*EGFR*) a été utilisé dans plusieurs études pour comprendre le mécanisme d'endocytose. Ce récepteur est devenue le modèle prototype pour étudier l'internalisation de RTK (86, 95).

Contrairement à d'autres récepteurs comme le TFR ou le LDLR qui subissent une internalisation constitutive, la plupart des RTKs ne sont internalisés qu'après la liaison de leur ligands.

La sélection des RTK à internaliser, par les molécules adaptatrices de clathrine, repose sur la reconnaissance de signaux d'endocytose présents dans leur région cytoplasmique. Il s'agit des motifs peptidiques contenant des résidus tyrosine comme NPxY et YxxØ ou contenant un doublet de résidus leucine comme D(E)xxxLL(I) (LL). Le motif YxxØ (Ø : résidu hydrophobe) et le motif di-leucine interagissent directement avec la protéine adaptatrice AP2. En effet, il a été démontré que l'internalisation du récepteur de l'EGF commence par une interaction directe entre le motif YxxØ, présents sur la queue cytoplasmique d'EGFR, et la sous unité  $\mu 2$  d'AP2. Cependant, l'internalisation des autres RTK ne dépend pas directement des AP-2. C'est le cas du récepteur de l'insuline (IR) dont les motifs NPxY interagissent avec des adaptateurs spécifiques, qui à leur tour, se lient à l'AP2 et à la clathrine (95).

L'ubiquitination pourrait être également un signal d'endocytose de RTK (86). En effet, des études menées sur le récepteur d'EGF ont montré que l'ubiquitination de ce dernier induit son recrutement dans les puits de clathrine par l'intermédiaire des protéines régulatrices comme l'epsin-1 et l'epsin-15. Ces protéines possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine et capable de se lier à la clathrine ou à sa molécule adaptatrice AP-2 (96-98).

### **3. Hypothèse et Objectifs :**

Le traitement du cancer par des anticorps monoclonaux (AcM) anti-PD-1 comme le nivolumab et le pembrolizumab a montré des résultats prometteurs dans différents types de cancer. Cependant, ces AcM ne bénéficient pas à tous les patients traités, seulement 30% en moyenne qui répondent à ce traitement.

Bien que le nivo et le pembro sont connus de bloquer l'interaction de PD-1 avec ses ligands PD-L1/PD-L2, aucune étude à ce jour n'a défini le devenir de PD-1 de surface après la liaison à ces deux AcM. Ceci est important car les niveaux d'expression du récepteur PD-1 sur les LT et le devenir des complexes PD-1/nivo ou PD-1/pembro pourraient déterminer l'efficacité thérapeutique du nivolumab et du pembrolizumab dans le traitement du cancer. Nous avons pensé donc d'étudier l'endocytose de PD-1 dans les LT suite à la liaison au nivo et au pembro

Notre hypothèse était que ces AcM induisent l'internalisation du PD-1, ce qui pourrait jouer un rôle important dans le potentiel thérapeutique de nivo et de pembro.

Nos objectifs étaient de définir le devenir de PD-1 à la suite de la liaison aux anticorps et de déterminer si les différents anti-PD-1 utilisés dans la clinique diffèrent dans leur capacité à induire l'endocytose du récepteur PD-1.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**



# 1. Matériel:

## 1.1 Cellules :

L'endocytose du récepteur PD-1 et du CD28 a été étudié sur les LT humains isolés à partir du sang périphérique de donneurs sains. Au cours de cette étude, le sang utilisé a été fourni par Héma-Québec sous forme d'anneau d'aphérèse ou LRS chamber (*LeucoReduction System chamber* (LRSC) (Figure 17). Cette dernière est considérée comme une source riche et viable de cellules mononuclées du sang (CMN) pouvant contenir jusqu'à 81% de leucocytes dont 56% de LT (99, 100).

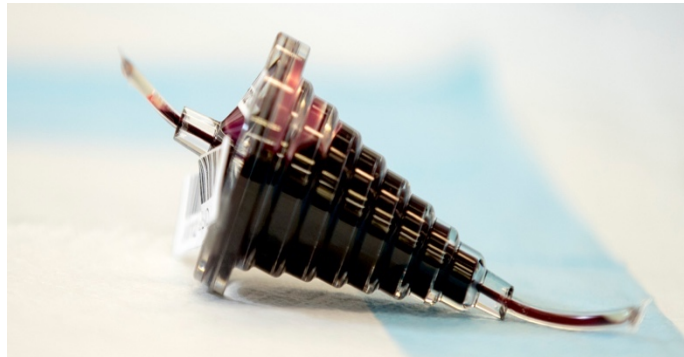


Figure 17: Anneau d'aphérèse ou LRS chamber

## 1.2 Réactifs :

### 1.2.1- Solutions :

Les CMN ont été isolées à partir du sang périphérique humain par Ficoll (*lymphocyte separation medium*, Corning, Fisher Scientific, CA). Ces cellules ont été mises en culture dans le milieu RPMI 1640 (Corning, Fisher Scientific, CA), enrichi de sérum de veau fœtal ou FBS à 10% et inactivé à la chaleur, de glutamine 200mM à 1 % et de pénicilline/streptomycine (10,000U/ml) à 1 % (Gibco, ThermoFisher, CA). Ce milieu de culture est désigné par RPMI1640 complet dans la section de méthode.

Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X (*Phosphate Buffered saline* à pH7.4, Corning, Fisher Scientific, CA). Le tampon FACS constitué de PBS et de FBS à 2% (PBS/2%FBS) a été utilisé pour laver les cellules après marquage.

### **1.2.2- Anticorps :**

Les anticorps (Ac) monoclonaux anti-CD3 (clone OKT3) et anti-CD28 (clone 9.2, BioXcell, USA) ont été utilisés pour activer les CMN pour qu'elles expriment le récepteur PD-1. La concanavaline A (conA) (Sigma Aldrich, USA) a été utilisée aussi dans le même but. L'identification des LT lors de l'analyse par cytométrie en flux a été déterminée par l'Ac anti-CD3 humain conjugué au fluorochrome phycoérythrine (PE-anti-CD3) (clone UCHT1, Biolegend, CA). L'endocytose de PD-1 ou de CD28 a été évaluée en utilisant un Ac monoclonal primaire de souris anti-PD-1 humain (clone J110, BioXcell, USA) ou un Ac monoclonal primaire de souris anti-CD28 humain (clone 9.2, BioXcell, USA). Les Ac primaires ont été détectés par un Ac secondaire d'âne anti-IgG souris conjugué au fluorochrome Alexa Fluor 647 (AF647-anti-IgG souris) (Invitrogen, CA).

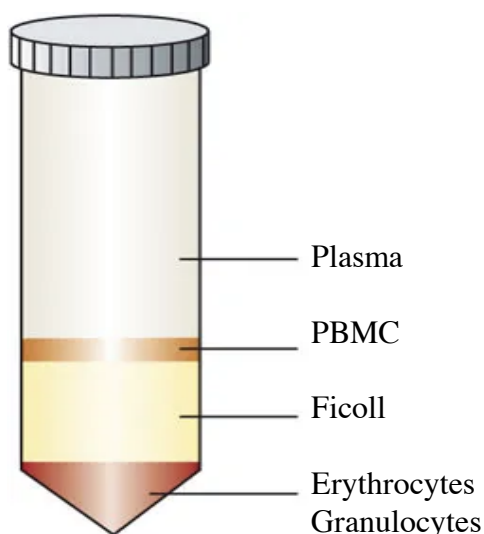
Dans l'approche directe, l'internalisation de PD-1 a été testée suite à sa liaison à l'Ac monoclonal de souris anti-PD-1 humain, conjugué au PE (PE-anti-PD1) (clone EH12.1, BD Biosciences, CA). L'endocytose de PD-1 a aussi été évaluée après liaison à un ou à deux autres anticorps monoclonaux (AcM) anti-PD1 humain: nivolumab et pembrolizumab (Selleckchem, USA). Ces deux AcM ont ensuite été détectés avec un Ac secondaire de chèvre anti-IgG humain conjugué à l'Alexa Fluor 488 (AF488-anti-IgG humain) (Invitrogen, CA).

## **2. Méthodes :**

### **2.1 Isolement de cellules mononuclées du sang périphérique (CMN) :**

A partir de chambre LRS, les CMN ont été isolées en utilisant du Ficoll. Cette méthode consiste à centrifuger le sang sur un gradient de polysaccharides de différentes densités afin d'obtenir une couche de CMN en forme d'anneau bien distincte, tout en laissant les érythrocytes et les granulocytes dans le culot (Figure 18). En effet, 15 ml de Ficoll ont été distribués dans des tubes de 50ml et laissé à température ambiante toute une nuit. Le sang a été dilué au 1/11<sup>ème</sup> dans du PBS et déposé sur le Ficoll. Les tubes ont été ensuite centrifugés à 2000rpm pendant 25min sans frein à température ambiante. L'anneau de CMN de chaque tube a été récupéré dans un nouveau tube de 50ml et lavé deux fois. Le premier lavage a été effectué avec 45ml de PBS 1X puis les cellules ont été centrifugées 20min à 1600rpm et le second a été effectué avec 45ml de milieu RPMI1640 complet suivi d'une centrifugation de 15min à 1400rpm. Les culots de CMN obtenus ont ensuite été resuspendus dans 50ml de milieu RPMI1640 complet.

La viabilité et le comptage de CMN ont été fait par coloration au bleu de trypan en hématimètre de Neubauer.



**Figure 18: Isolement de cellules mononuclées par la méthode de Ficoll-Hypaque (101)**

## **2.2 Stimulation des CMN et expression du récepteur PD-1 :**

Afin d'exprimer le récepteur PD-1, les CMN isolées ont été stimulées avec les Ac anti-CD3 et anti-CD28 solubles à 3 et 2 $\mu$ g/ml respectivement, pendant 2 jours.

La concanavaline A (conA) a été utilisée aussi pour activer les CMN à 10 $\mu$ g/ml pendant 2 jours. Les cellules ont été ensuite lavées avec le milieu RPMI1640 complet et laissées toute une nuit dans l'incubateur à 5% CO<sub>2</sub>.

Note : La conA est une lectine extraite d'haricot sabre (*Canavalia ensiformis*) qui se lie spécifiquement au D-mannose et au D-glucose. Elle permet l'activation de lymphocytes T en interagissant directement avec leurs récepteurs (102, 103).

## **2.3 Étude de l'endocytose du récepteur PD-1 après liaison à l'Ac anti-PD1 (clone J110) dans les LT humains :**

En se basant sur les techniques décrites dans l'article de Céfaï et al (104) et dans d'autres articles (105), la possibilité de l'endocytose du récepteur PD-1 dans les LT humains a été étudié par la

méthode d'internalisation et la méthode de régulation négative du récepteur ou “*down-modulation*” .

### **2.3.1- Méthode d'internalisation :**

#### **a. Principe :**

Cette méthode consiste à incuber les LT humains exprimant le récepteur PD-1 avec un Ac anti-PD-1 humain marqué à un fluorochrome. Les cellules sont ensuite mises à 37°C à différents temps d'incubation afin d'induire l'internalisation du complexe PD-1/anti-PD-1. A chaque temps donné, les cellules sont lavées et traitées ou non avec la solution de PBS acidifié (pH=2). Cette étape permet d'éliminer l'Ac resté à la surface. La fluorescence de groupe traité représente le complexe PD-1/Ac anti-PD1 intracellulaire (internalisé) alors que la fluorescence de groupe non traité représente le complexe intra et extracellulaire.

#### **b. Mise au point de la méthode d'internalisation :**

Nous avons essayé d'optimiser plusieurs paramètres dans le but de mettre au point une méthode fiable dans l'étude de l'internalisation de PD-1. Tout d'abord, l'internalisation du PD-1 dans les LT humains a été testée par deux approches : une directe et une autre indirecte.

##### **❖ Approche directe :**

Dans le cas de l'approche directe, le récepteur PD-1 a été directement lié à un Ac anti-PD-1 humain conjugué au PE. La possibilité d'internalisation du complexe PD-1/PE-anti-PD1 a été ensuite étudiée comme suit : les CMN, activées avec les Ac anti-CD3/anti-CD28, ont été lavées au PBS et incubées avec 1µg/ml de PE-anti-PD-1 humain pendant 40 min sur glace. Les CMN ont ensuite été lavées, resuspendues dans le milieu RPMI1640 complet et mises à 37°C à différents temps d'incubation. Un aliquot de ces mêmes cellules a été incubé sur glace pendant 90 min pour comparer l'internalisation de PD-1 par rapport à l'incubation effectuée 37°C. Pour chaque temps donné, les cellules ont été collectées sur glace, lavées avec du PBS froid et réparties en deux groupes:

- Un groupe de CMN a été traité sur glace avec une solution de PBS à pH=2 afin d'éliminer l'Ac PE-anti-PD1 humain resté à la surface. La fluorescence de ce groupe représente le complexe PD-1/PE-anti-PD1 intracellulaire (internalisé).

- Un autre groupe de CMN a été maintenu sur glace sans traitement. La fluorescence de ce groupe représente le complexe PD-1/PE-anti-PD1 extra et intracellulaire.

❖ Approche indirecte :

Dans ce cas, les CMN exprimant le récepteur PD-1 ont été incubées avec 1µg/ml d'un Ac primaire anti-PD-1 humain (clone J110). Après 40 min sur glace, les CMN ont été lavées et incubées avec 1µg/ml d'un Ac secondaire d'âne AF647-anti-IgG souris. L'internalisation du complexe PD-1/anti-PD1/AF647-anti-IgG a été déterminée par la méthode décrite dans l'approche directe.

Par la suite, deux solutions à pH acidifié ont été testées afin de déterminer leur efficacité sur l'élimination du ligand non internalisé et leur effet sur la viabilité de CMN traitées.

❖ Tampon d'acétate de sodium à pH 2.5

Cette solution est composée d'acide acétique à 0.2M et de chlorure de sodium (NaCl) à 0.5M avec un pH égale à 2.5. Cette solution a servi à éliminer l'Ac PE-anti-PD1 humain (approche directe) ou le complexe anti-PD1/AF647-anti-IgG (approche indirecte) non internalisés. La viabilité de ce groupe a été évaluée par le colorant cationique 7-AAD.

❖ Solution de PBS acidifié à pH 2

Cette solution est composée de PBS supplémenté avec du sucrose à 0.03M et de FCS à 10%. Le pH de cette solution est ajusté à 2.0 avec de l'acide chlorhydrique (HCl). Cette solution a été aussi utilisée pour éliminer le complexe non internalisé et la viabilité de cellules à été vérifié par 7-AAD. En se basant sur les meilleurs résultats, notre choix s'est porté sur l'utilisation de l'approche indirecte (voir Figure S1) et sur le traitement par la solution de PBS acidifié (pH2) (Figure S2).

***c. Protocole définitif d'internalisation:***

➤ Cas de PD-1 exprimé sur les CMN activées avec anti-CD3/CD28 :

Les CMN humaines activées ont été collectées, lavées avec le PBS 1X et incubées avec du PBS/sérum d'âne (10%) afin de bloquer les récepteurs Fc. Après 20min à température ambiante, les CMN ont été lavées et incubées avec 1µg/ml d'Ac primaire anti-PD-1 humain (clone J110) pendant 40min sur glace.

Après lavage, un Ac secondaire d'âne AF647-anti-IgG souris, préalablement dilué au 1/10 dans le PBS/ sérum d'âne (1%), a été ajouté. Après 40 min sur glace, les cellules ont été lavées, resuspendues dans le milieu RPMI 1640 complet froid et mises à 37°C à différent temps d'incubation (0, 15, 30, 60 et 90min). Un aliquot de CMN a été maintenu sur glace pendant 90 min pour vérifier l'expression initiale de PD-1 (groupe non traité) et contrôler l'efficacité de traitement par PBS acidifié (groupe traité) (Figure S3). Pour chaque temps donné, les CMN ont été lavées deux fois avec le PBS 1X froid et réparties en deux groupes : Un groupe a été maintenu sur glace sans traitement et un autre a été traité avec la solution froide de PBS additionnée de 0.03M de sucrose et de 10% FBS et ajustée à pH 2.0 avec le HCl. Les CMN ont été incubées avec 500  $\mu$ l de la solution acidifiée pendant 3 min sur glace. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois dans une large quantité de solution froide de RPMI 1640 supplémentée de 100mM de tampon HEPES et de 10% de FCS. Tous les échantillons de CMN traitées ou non, incubées sur glace ou à 37°C à différents temps, ont été lavés avec le PBS1X/ FBS 2% et additionnées de 2 $\mu$ l de marqueur de viabilité 7-AAD avant d'être analysés par cytométrie en flux (CF) le jour même.

Il est à noter que le nombre de CMN utilisé pour chaque temps d'incubation et pour chaque condition a été de  $2.5 \times 10^6$ . Toutes les centrifugations et les lavages de CMN ont été faits à 4°C. De plus, afin de s'assurer de l'absence de résultats faussement positifs, les CMN exprimant le récepteur PD1 ont été incubées seulement avec l'Ac secondaire AF647-anti-IgG de souris (contrôle négatif) et traitées dans les différents conditions de la même manière que précédemment.

➤ Cas de PD-1 exprimé sur des CMN activées par le conA à 10  $\mu$ g/ml:

Afin de s'assurer que le récepteur CD28 n'interfère pas avec nos résultats, l'internalisation du récepteur PD-1 a été aussi étudiée sur des cellules activées par conA à 10 $\mu$ g/ml. La méthode d'internalisation utilisée est similaire à celle décrite précédemment mais une autre étape finale a été ajoutée dans ce cas. Les échantillons de CMN ont été incubées avec PE-anti-CD3 humain au 1/100 pendant 30 min sur glace. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS/FBS 2% et la viabilité de ces cellules a été déterminée par le 7-AAD.

Note : Pas de différence dans le taux d'internalisation de PD-1 entre les CMN activées avec anti-CD3/anti-CD28 et celles activées par conA (voir S4).

➤ Cas du récepteur CD28 :

En plus du récepteur PD-1, l'internalisation du récepteur CD28 dans les LT humains a été aussi étudiée. Dans ce cas, les CMN ont été lavées avec du PBS 1X et incubées avec 1µg/ml d'Ac anti-CD28 humain (clone 9.2) pendant 40 min sur glace. Après lavage avec du PBS froid, 1µg/ml d'Ac AF647-IgG souris a été ajouté aux CMN et incubé pendant 40 min sur glace. Les étapes suivantes de la méthode d'internalisation sont similaires à celles décrites dans le cas du récepteur PD-1.

➤ Comparaison entre le récepteur CD28 et PD-1 :

Dans ce cas, les CMN, stimulées avec la conA, ont été lavées et réparties en deux groupes : un a été incubé avec 1µg/ml d'anti-CD28 humain (clone 9.2) et un autre avec 1µg/ml d'anti-PD-1 humain (clone J110) pendant 40 min sur glace. Chaque groupe de CMN a été ensuite incubé avec un Ac secondaire AF647-anti-IgG de souris au 1µg/ml pendant 40 min sur glace. L'internalisation du PD-1 et du CD28 a été étudié par la même méthode décrite dans la section (c).

**2.3.2- Méthode de régulation négative ou down-modulation :**

En plus de la méthode d'internalisation, l'endocytose du récepteur PD-1 dans les LT humains a été évaluée aussi par la méthode de régulation négative ou *down-modulation*.

**a- Principe :**

Cette méthode consiste à incuber les LT humains exprimant le récepteur PD-1 et CD28 avec un Ac primaire anti-PD-1 ou anti-CD28 humain. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant différents temps d'incubation afin d'initier l'endocytose de complexe PD-1/anti-PD-1 ou CD28-anti-CD28. Après chaque temps donné, un Ac secondaire anti-IgG conjugué à un fluorochrome est ajouté afin de détecter le complexe resté à la surface (non internalisé). Par conséquent, il y a un rapport inverse entre le signal fluorescent et le taux d'endocytose de PD-1 ou CD28.

**b- Protocole :**

Les CMN humaines, activées par anti-CD3/anti-CD28 ou par conA pendant 2 jours, ont été collectées, lavées avec du PBS1X et incubées avec du PBS/sérum d'âne (10%). Après 20min à température ambiante, les CMN ont été lavées et incubées avec 1µg/ml d'Ac anti-PD-1 humain

(clone J110) ou 1 $\mu$ g/ml d'anti-CD28. Après 40 min sur glace, les CMN ont été lavées, resuspendues dans le milieu RPMI 1640 froid, réparties à raison de 2.5x10<sup>6</sup> par tube et mises à 37°C à différents temps d'incubation (0, 15, 30, 60 et 90min). Un aliquot de CMN a été maintenu sur glace pendant 90min, la fluorescence de ces cellules représente le complexe PD-1/anti-PD1 humain ou CD28/anti-CD28 extracellulaire (non internalisé). En chaque temps donné, les CMN ont été collectées sur glace, lavées au PBS froid et incubées avec 1 $\mu$ g/ml d'Ac AF647-anti-IgG souris pendant 40min sur glace. Après lavage au PBS/2% FBS froid, le marqueur de viabilité 7-AAD a été ajouté et les cellules ont été analysées par cytométrie en flux le jour même.

**Remarque :**

- Comme contrôle négatif, les CMN exprimant le récepteur PD-1 ont été incubées seulement avec l'Ac secondaire AF647-anti-IgG souris (même cas pour le récepteur CD28).
- Dans le cas de cellules activées par conA et après toutes les étapes de down-modulation, les CMN ont été incubées avec PE-anti-CD3 au 1/100 pendant 30min sur glace, lavées au PBS/2% FBS et ajoutées de 7-AAD avant d'être analysées par CF le jour même.
- Si les échantillons de cellules ne sont pas analysés le jour même, ils sont fixés par PFA à 2% pendant 20min à température ambiante, lavés avec PBS/2% FBS et mis dans le réfrigérateur jusqu'au jour d'analyse par CF.

Afin de comparer la régulation négative du récepteur PD-1 avec celle de CD28, les CMN stimulées avec le conA à 10 $\mu$ g/ml, ont été lavées et réparties en deux aliquots après le blocage des récepteurs Fc: un aliquot a été incubé avec 1 $\mu$ g/ml d'anti-CD28 humain (clone 9.2) et un autre avec 1 $\mu$ g/ml d'anti-PD-1 humain (clone J110) pendant 40 min sur glace. La suite des étapes est similaire à celles décrites précédemment.

## **2.4 Caractérisation de nivo et de pembro *in vitro* :**

Avant d'étudier l'endocytose de PD-1 après liaison au nivo et/ou pembro, nous avons caractérisé ce deux AcM *in vitro*.

### ***2.4.1 Titration des AcM nivo et pembro afin de déterminer la concentration optimale de liaison avec le récepteur PD-1 :***

Afin d'établir une liaison optimale avec le récepteur PD-1, différentes concentrations de nivo et de pembro ont été évaluées (Figure S5).



En effet, les CMN humaines, activées avec le conA, ont été collectées, lavées avec le PBS 1X et incubées séparément avec de nivo ou de pembro à différentes concentrations (0.5, 1, 2 et 5 $\mu$ g/ml) pendant 40 min sur glace. Ensuite, les cellules ont été lavées avec le PBS froid et incubées avec 1 $\mu$ g/ml d'un Ac secondaire de chèvre AF488-anti-IgG humain pendant 40min sur glace. Après lavage au PBS/2% FBS froid, l'Ac PE-anti-CD3 a été ajouté au 1/100<sup>ème</sup> aux CMN pendant 30min sur glace. Les différents échantillons de CMN ont été lavées avec le PBS/2% FBS froid et la viabilité a été vérifiée par 7-AAD lors de l'analyse par cytométrie en flux.

Les données ont montré que les différentes concentrations de nivo ou de pembro n'ont pas d'effet sur leur liaison sur le récepteur PD-1 (figure S5). Par conséquent la concentration de 1 $\mu$ g/ml pour nivo et pour pembro a été considérée comme concentration optimale et a été retenue pour la suite.

#### ***2.4.2- Différence entre le domaine de liaison de nivo et de celui du pembro sur le récepteur PD-1 :***

Pour ce faire, trois groupes de CMN ont été étudiés :

- Groupe utilisé comme **contrôle négatif** : Les CMN, pré-activées avec le ConA, ont été incubées avec 1 $\mu$ g/ml d'Ac secondaire AF488-anti-IgG humain pendant 30 min sur glace. Après lavage avec le PBS froid, les CMN ont été incubées avec du nivo à une concentration de 1 $\mu$ g/ml pendant 30min sur glace.
- Groupe utilisé comme **contrôle positif** : Les CMN activées ont été incubées avec du pembro à 1 $\mu$ g/ml pendant 30 min sur glace. Puis les cellules ont été lavées et incubées avec un Ac secondaire AF488-anti-IgG humain à une concentration de 1 $\mu$ g/ml pendant 30 min sur glace.
- Groupe où **nivo et de pembro mis en compétition** vis à vis le PD-1 : les CMN activées ont été incubées avec du pembro à 1 $\mu$ g/ml pendant 30min sur glace. Après lavage, les CMN ont été incubées avec l'Ac secondaire AF488-anti-IgG humain à 1 $\mu$ g/ml pendant 30 min sur glace.

Les cellules ont été ensuite lavées avec le PBS froid et incubées avec 1 $\mu$ g/ml de nivo pendant 30 min sur glace. Les CMN de différents groupes ont été lavées avec le PBS/2%FBS et ajouté de 7-AAD avant d'être analysées par cytométrie en flux le jour même.

## **2.5 Étude de l'endocytose du récepteur PD-1 après liaison au nivo et/ou pembro dans les LT humains par la méthode de *downmodulation* :**

Pour ce faire, les CMN humaines pré-activées avec le conA à 10 $\mu$ g/ml pendant 2 jours, ont été lavées avec le PBS1X et incubées avec le PBS/10% sérum de chèvre pendant 20 min afin de bloquer les récepteurs Fc. Après lavage, les CMN ont été réparties en 3 groupes. Le premier groupe a été incubé avec 1 $\mu$ g/ml de nivo, un autre avec 1 $\mu$ g/ml de pembro et le 3<sup>ème</sup> avec 1 $\mu$ g/ml de nivo et 1 $\mu$ g/ml de pembro pendant 40 min sur glace. Ensuite, les cellules ont été lavées par le PBS froid, resuspendues dans le RPMI 1640, réparties dans différents tubes à raison de 2.5x10<sup>6</sup> cellules par tube et mises à 37°C à différent temps d'incubation (0, 15, 30, 60, 90, 120min). Comme contrôle, un aliquot de chaque groupe a été maintenu sur glace pendant 90min. En un temps donné, les différents échantillons de CMN ont été collectés sur glace, lavés avec le PBS froid et incubés avec 1 $\mu$ g/ml d'un Ac de chèvre AF488-anti-IgG humain (préalablement dilué dans du PBS/1% de sérum de chèvre). Cette étape permet de détecter le complexe PD-1/nivo ou PD-1/pembro non internalisé. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites dans la section de PD-1. Comme contrôle négatif, les CMN ont été incubées seulement avec l'Ac secondaire AF488-anti-IgG humain et traitées dans les différentes conditions de la même manière que les autres échantillons.

## **2.6 Étude de l'endocytose de PD-1 par microscopie à fluorescence :**

L'endocytose du récepteur PD-1 dans les LT humains a été déterminée aussi par microscopie à fluorescence. Dans ce cas, les CMN activées ont été lavées et incubées soit avec 1 $\mu$ g/ml d'Ac anti-PD1 (clone J110) soit avec 1 $\mu$ g/ml de nivo pendant 40min sur glace. Après lavage à froid, un Ac secondaire AF647-anti-IgG de souris et un autre AF488-anti-IgG humain ont été ajoutés aux cellules pré-incubées avec le clone J110 ou nivo, respectivement. Après 40min sur glace, les cellules ont été lavées, resuspendues dans du RPMI 1640 froid et réparties en deux groupes. Le premier groupe a été incubé à 4°C pendant 90 min et le second à 37°C pendant 30 min. Les CMN ont été collectées sur glace, lavées dans du PBS froid et chaque groupe a été divisé en deux sous-groupes: un a été maintenu sur glace sans traitement et l'autre a été traité avec du PBS acidifié (pH2) pendant 3min sur glace. Les CMN traitées ont ensuite été lavées 3 fois dans une large quantité de milieu RPMI 1640 supplémenté avec 0.03M sucrose et 100mM de tampon HEPES.

Tous les échantillons de cellules ont été lavées avec le PBS froid et fixées avec le PFA à 2% pendant 20 min à température ambiante. Après lavage au PBS/2% FBS, 300  $\mu$ l de cellules concentrées à  $45 \times 10^4$  de chaque condition a été centrifugé par cytospin à 600rpm pendant 7min (une lame de verre par condition a été utilisé). Un lavage de 2min avec de l'éthanol à 70% puis à 100% a été appliqué sur le spot de cellules fixé sur chaque lame de verre. Avant d'être trop séché, le spot de cellules a été ajouté de 10 $\mu$ l d'anti-fade mounting media (Vecta-shield) (pré-additionné de DAPI au 1 $\mu$ g/ml) et recouverte par une lamelle. Les lames ont été mises au réfrigérateur jusqu'au jour d'analyse par microscopie à fluorescence.

## **2.7 Détermination de la voie impliquée dans l'endocytose du récepteur**

### **PD-1 dans les LT humains :**

Nous avons utilisé les mêmes étapes décrites dans l'internalisation et le *down-modulation* mais dans ce cas, les CMN ont été resuspendues dans du RPMI 1640 froid en absence ou présence du sucrose à 0.45M et incubées à 37°C à différent temps ou à 4°C pendant 90min (contrôle). Le nombre de CMN a été de  $2.5 \times 10^6$  par temps d'incubation et la viabilité de ces cellules a été vérifié par le marqueur 7-AAD.

### **2.8 Collecte et analyse des données :**

- L'acquisition des résultats de cytométrie en flux ont été obtenus avec le LSRII (BD Biosciences, USA). Pour chaque acquisition, le nombre de cellules enregistré est de 100.000. Les données recueillies ont été analysées avec le logiciel FlowJo (version 10). Afin de normaliser les MFI mesurées, la MFI du contrôle négatif (CN) (cellules incubées seulement avec l'Ac secondaire) a été soustraite de la MFI de cellules d'étude.
- Le taux d'internalisation du récepteur PD-1 ou CD28 en un temps donné ( $t_x$ ) a été déterminé comme suit :  $(\text{MFI}(\text{traité à pH2})_{t_x} - \text{MFI}(\text{CN})) / (\text{MFI}(\text{non traité})_{t_x} - \text{MFI}(\text{CN})) \times 100$
- Le taux de "*down-modulation*" du récepteur PD-1 ou CD28 en un temps donné a été déterminé par rapport au MFI des cellules en ( $t_0$ ) comme suit :  $(\text{MFI } t_x - \text{MFI}(\text{CN})) / (\text{MFI } t_0 - \text{MFI}(\text{CN})) \times 100$
- Les résultats de l'expression de PD-1, de taux d'internalisation et de taux de "*down-modulation*" ont été présentés comme des moyennes  $\pm$  écart-type (SD) à partir d'au moins trois expériences indépendantes.

- Les graphiques et les analyses statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8) : la comparaison statistique de l'endocytose en absence et en présence de sucrose a été déterminée en premier par l'aire sous la courbe (AUC) et ensuite un test t de student non apparié a été appliqué. Cette analyse a été utilisée aussi lors de la comparaison de l'endocytose de PD-1 après liaison au nivo ou pembro.
- L'étude par microscopie à fluorescence de l'internalisation du récepteur PD-1 dans les LT humains a été réalisée par le système d'imagerie widefield Zeiss motorisé avec AxioVision comme logiciel. Le traitement des images a été fait par le logiciel Fiji (Fiji is just ImageJ, version 1.0).

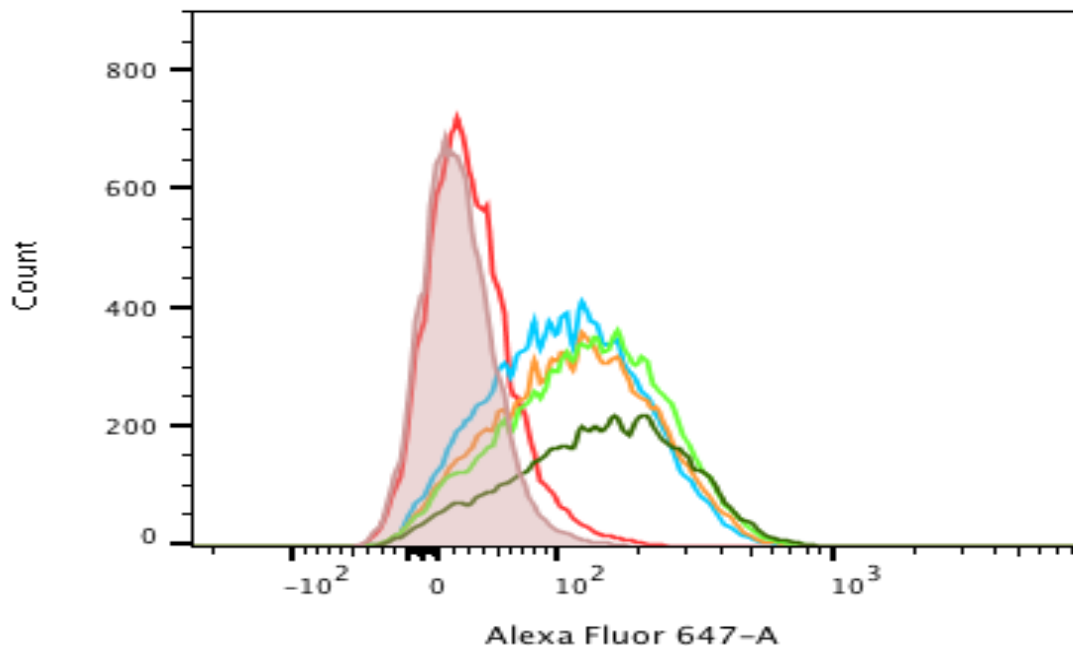
# RÉSULTATS

# 1. Étude de l'endocytose du récepteur PD-1 dans les LT humains après liaison aux Ac anti-PD-1 (clone J110) :

## 1.1- Internalisation du récepteur PD-1 dans les LT humains :

### 1.1.1- Analyse par cytométrie en flux (CF) :

L'analyse par CF a montré qu'il y a absence de fluorescence dans les LT incubés à 4°C et traités avec le PBS (pH=2), alors qu'il existe un signal fluorescent pour les cellules incubées à 37°C à différents temps et traitées par le PBS acidifié. Ce signal augmente avec le temps d'incubation (Figure 20). Ces résultats montrent que le complexe PD-1/anti-PD-1/AF647-anti-IgG est internalisé dans les LT humains à 37°C.

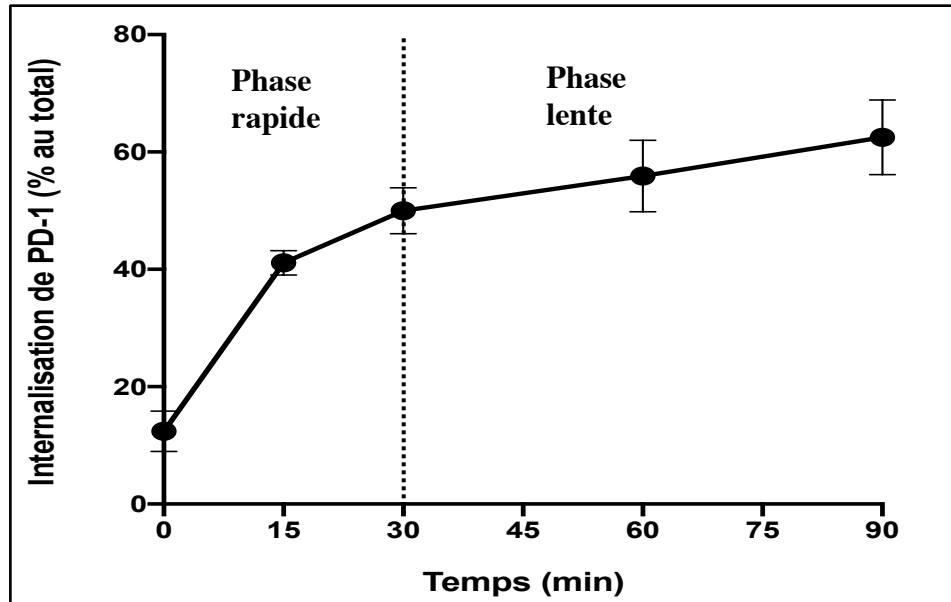


**Figure 19: Analyse par cytométrie en flux de LT humains incubés à 4°C ou à 37°C à différents temps et traités avec le PBS acidifié**

#### Légende :

- CMN incubées à 4°C pendant 90min et traitées avec le PBS à pH2
- CMN incubées à 37°C pendant 0min et traitées avec le PBS à pH2
- CMN incubées à 37°C pendant 15 min et traitées avec le PBS à pH2
- CMN incubées à 37°C pendant 30 min et traitées avec le PBS à pH2
- CMN incubées à 37°C pendant 60 min et traitées avec le PBS à pH2
- CMN incubées à 37°C pendant 90 min et traitées avec le PBS à pH2

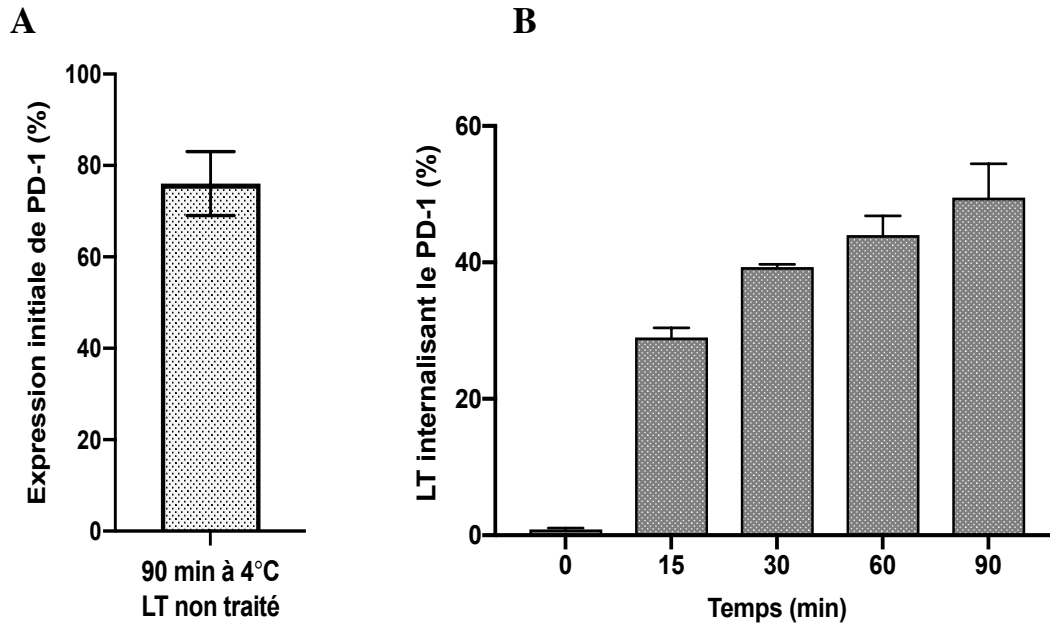
L'étude du ratio de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du groupe de cellules traitées avec le PBS acidifié par rapport à la MFI du groupe de cellules non traitées, a révélé que le complexe PD-1/anti-PD-1/anti-IgG-AF647 a subi une internalisation rapide, principalement dans les premiers 30 minutes suivant l'incubation de LT à 37°C. En effet, 50% du complexe est internalisé en 30 min et atteignant 62% après 90 min d'incubation (Figure 21).



**Figure 20: Taux moyen d'internalisation du récepteur PD-1 dans les lymphocytes T humains en fonction du temps d'incubation (min)**

La figure 21 représente le taux moyen d'internalisation du PD-1  $\pm$  SD à partir de 5 expériences indépendantes.

En plus de l'analyse par MFI, nous avons aussi déterminé la fréquence de LT qui internalisent le récepteur PD-1. Dans ce cas, le complexe PD-1/anti-PD1/AF647 a été évalué dans les cellules traitées avec le PBS acidifié (pH2) en fonction du temps d'incubation à 37°C (Figure 22).

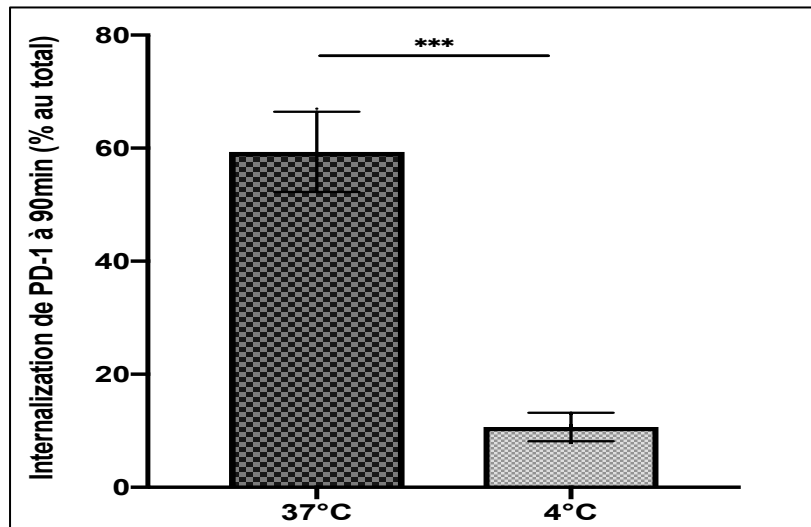


**Figure 21: Expression initiale de PD-1 sur les LT incubés à 4°C pendant 90 min et non traités avec le PBS acidifié (A), et fréquence de cellules internalisant le récepteur PD-1 (B)**

Les résultats ont montré que la fréquence de LT internalisant le récepteur PD-1 augmente avec le temps d'incubation à 37°C. En effet, parmi 77% de cellules T qui expriment le récepteur PD-1 (Figure 22.A), 49% ont internalisé le récepteur PD-1 après liaison à l'Ac anti-PD-1 (Figure 22.B). Ces résultats analysés à la base de cellules sont similaires à ceux analysés avec le MFI (Figure 21).

Le taux d'internalisation de PD-1 dans les LT a été aussi comparé entre les cellules incubées à 37°C et à 4°C pendant 90 min et traitées avec le PBS acidifié (pH2). L'analyse statistique a montré une différence statistiquement significative entre ces deux groupes ( $p=0.0004$ ), ce qui suggère que l'internalisation de récepteur PD-1 dans les LT humains est effectuée à 37°C et non pas à 4°C (Figure 23).





**Figure 22: Taux d'internalisation du récepteur PD-1 dans les cellules T humaines**

\*\*\* (p=0.0004 par le test T de Student non apparié)

### *1.1.2- Analyse par Microscopie à fluorescence :*

En plus de la technique de cytométrie en flux, l'internalisation du récepteur PD-1 a été visualisée aussi par microscopie à fluorescence (Figure 24). En effet, les LT humains, exprimant au préalable le récepteur PD-1 et incubés avec les Ac anti-PD-1 et AF647-anti-IgG, ont été répartis en quatre conditions:

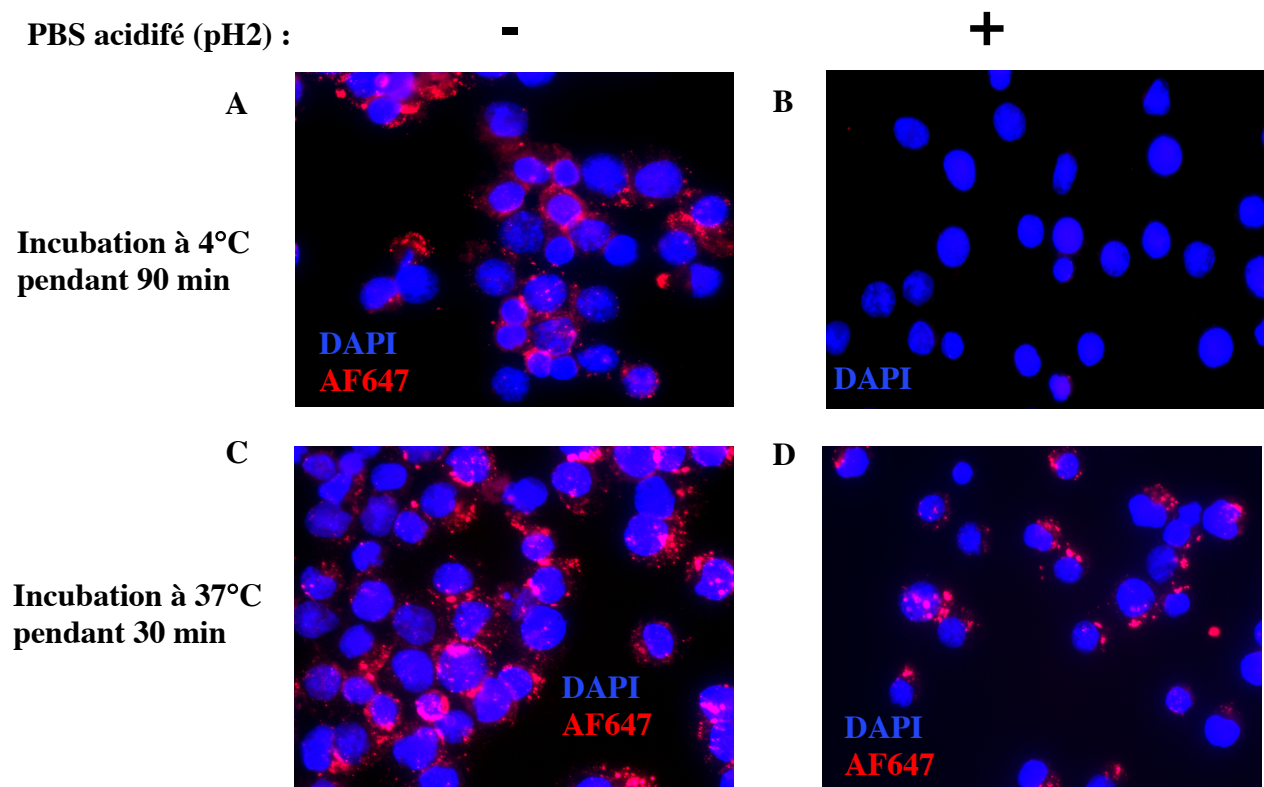
- Incubation à 4°C pendant 90 min sans traitement par le PBS acidifié (pH2)
- Incubation à 4°C pendant 90 min et traitement avec le PBS acidifié
- Incubation à 37°C pendant 30 min sans traitement par le PBS acidifié
- Incubation à 37°C pendant 30 min et traitement avec le PBS acidifié.

Les cellules ont ensuite été fixées avec de la PFA 2% et centrifugées par cytopspin afin de les déposer sur une lame de verre. Les noyaux de cellules sont colorés au DAPI (bleu).

L'analyse par microscopie à fluorescence a démontré que les cellules incubées à 4°C pendant 90 min sans traitement présentent une fluorescence qui correspond au complexe PD-1/anti-PD-1/AF647-anti-IgG membranaire (non internalisé) (Figure 24A). Cependant, les cellules traitées au

PBS acidifié n'ont montré aucun signal fluorescent, ce qui indique une élimination complète de complexe anti-PD-1/AF647-anti-IgG (Figure 24B).

Comparativement aux cellules incubées à 37°C pendant 30min sans traitement qui montrent un signal fluorescent correspondant au complexe PD-1/anti-PD-1/AF647-anti-IgG membranaire et intracellulaire (Figure 24C), les cellules traitées à l'acide (PBS à pH2) présentent aussi une fluorescence (Figure 24D). Ces observations confirment qu'une proportion de récepteur PD-1 de surface est internalisé dans les cellules T humaines après liaison aux Ac anti-PD-1.



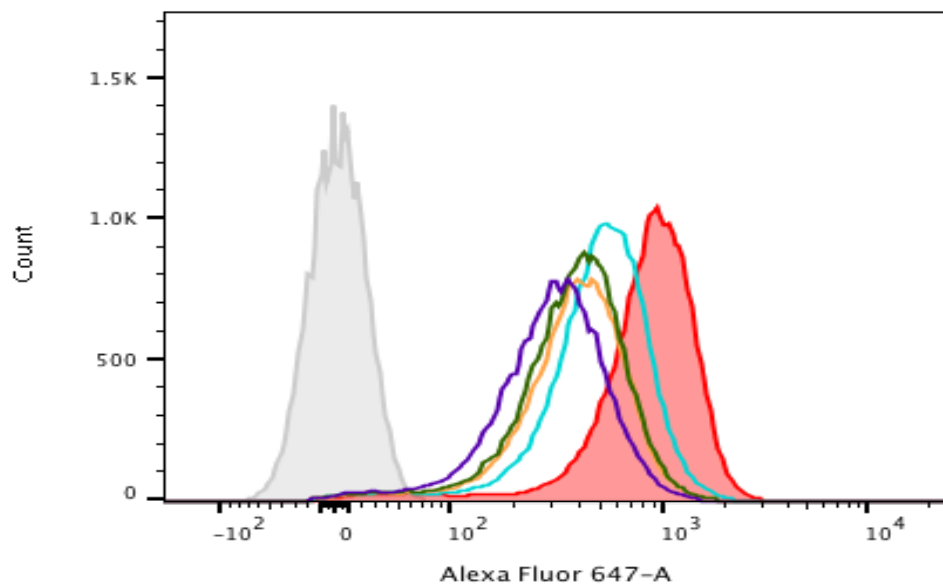
**Figure 23: Analyse par microscopie à fluorescence de l'internalisation de récepteur PD-1 dans les cellules T humaines (grossissement : x63)**

### 1.2- Régulation négative du récepteur PD-1 dans les cellules T humaines :

Cette approche consiste à incuber les cellules humaines, exprimant le récepteur PD-1 après activation, avec 1 $\mu$ g/ml d'Ac anti-PD-1 (clone J110) pendant 40 min sur glace. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées à 37°C à différents temps (0, 15, 30, 60 et 90 min).

Après chaque temps d'incubation, les cellules ont été lavées et incubées avec  $1\mu\text{g/ml}$  d'Ac AF647-anti-IgG souris pendant 40 min sur glace. Cette étape consiste à détecter seulement le complexe PD-1/anti-PD-1 membranaire (non internalisé).

L'analyse par cytométrie en flux a montré que le signal fluorescent d'Ac anti-IgG-AF647 diminue avec le temps d'incubation. Cette observation suggère qu'il y a une régulation négative de complexe PD-1/anti-PD1 dans les cellules T humaines puisque l'Ac anti-IgG-AF647 ne représente que le complexe membranaire (Figure 25).

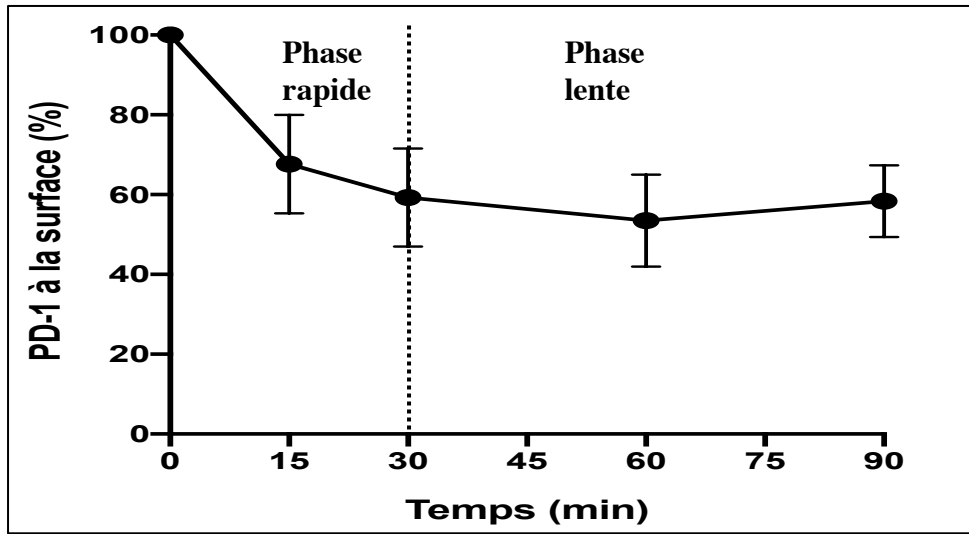


**Figure 24: Analyse par cytométrie en flux de la régulation du complexe PD-1/anti-PD-1 dans les cellules T humaines en fonction du temps d'incubation (min)**

**Légende :**

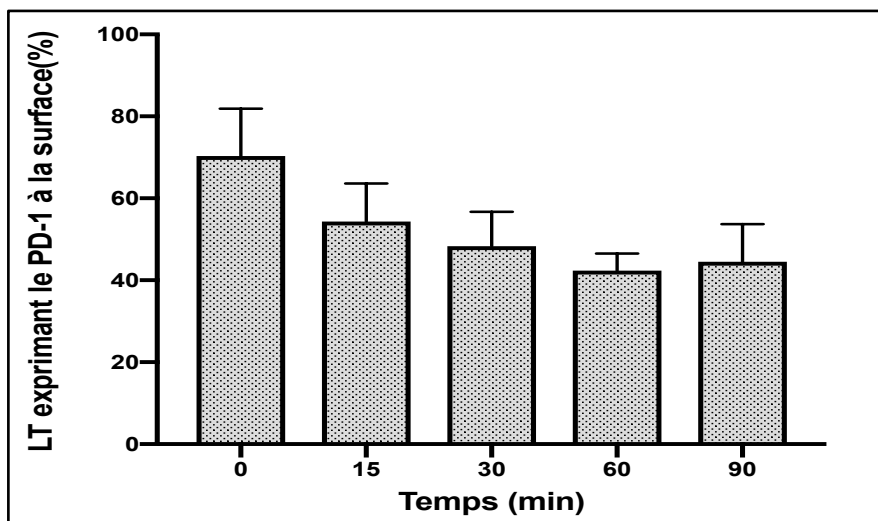
- Contrôle négatif : CMN incubées seulement avec l'Ac secondaire
- Incubation à 37°C pendant 0 min
- Incubation à 37°C pendant 15 min
- Incubation à 37°C pendant 30 min
- Incubation à 37°C pendant 60 min
- Incubation à 37°C pendant 90 min

L'analyse du ratio de la MFI des cellules incubées à 37°C à différents intervalles de temps par rapport à la MFI des cellules en temps  $t_0$  révèle une endocytose rapide du complexe PD-1/anti-PD1 particulièrement dans les 30 premières minutes suivant l'incubation des LT à 37°C. En effet, 40% à 52% du complexe est internalisé entre 30 et 90 min respectivement (Figure 26).



**Figure 25: Régulation négative moyenne du récepteur PD-1 dans les cellules T humaines en fonction de temps d'incubation (min) (nombre d'expérience=4)**

D'autre part, l'analyse à base cellulaire a montré que la fréquence de LT, exprimant le récepteur PD-1 à la surface, diminue avec le temps d'incubation de ces cellules à 37°C (Figure 27).



**Figure 26: Fréquence de cellules T exprimant le récepteur PD-1 à la surface**

## 2. Étude de l'endocytose du récepteur CD28 dans les LT humains :

En plus de récepteur PD-1, nous avons évalué l'endocytose du récepteur CD28 dans les cellules T humaines par la méthode d'internalisation et par la méthode de régulation négative de récepteur. Les résultats obtenus par la méthode d'internalisation ont montré que le récepteur CD28 est internalisé dans les cellules T humaines avec un taux allant de 35% après 15 min jusqu'à 50% après 90 min (Figure 28). Ces résultats sont confirmés par la méthode de *downmodulation* (Figure 29).

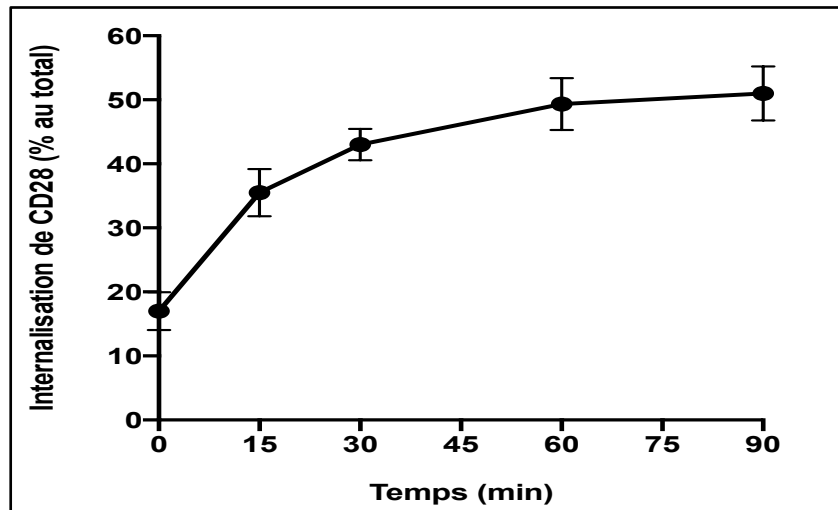


Figure 27: Taux d'internalisation moyen du récepteur CD28 dans les LT humains (n=4)

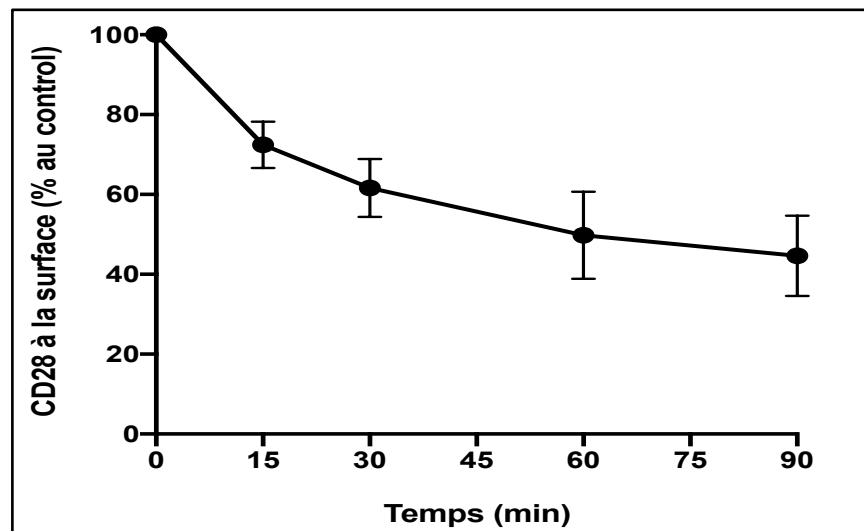


Figure 28: Régulation négative moyenne du récepteur CD28 dans les LT humains (n=4)

La comparaison entre l'endocytose du récepteur CD28 avec celle de PD-1 dans les LT humains a montré des résultats similaires entre ce deux récepteurs du point de vue taux d'internalisation et cinétique (Figures 30 et 31).

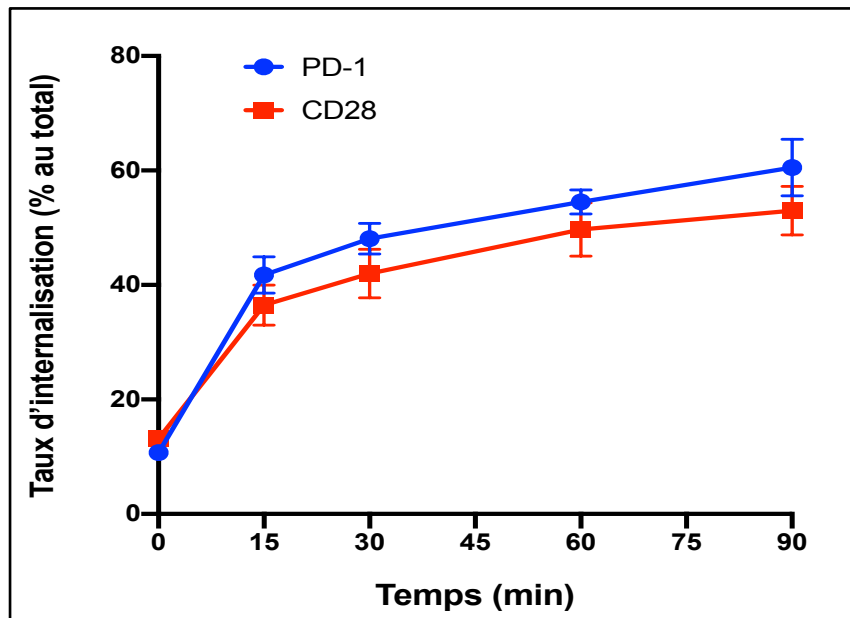


Figure 29: Comparaison entre l'internalisation de récepteur PD-1 et celui de CD28

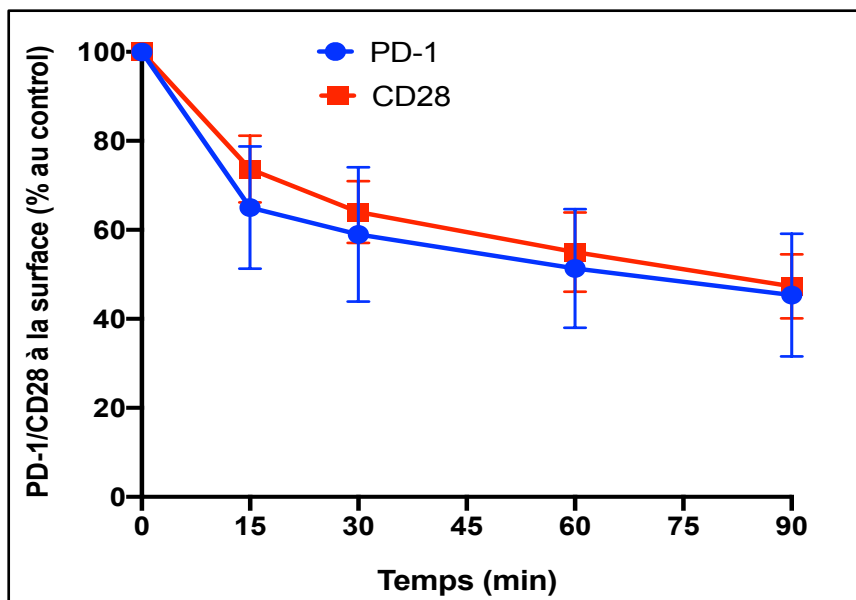


Figure 30: Comparaison entre la régulation négative de récepteur PD-1 et celle de CD28

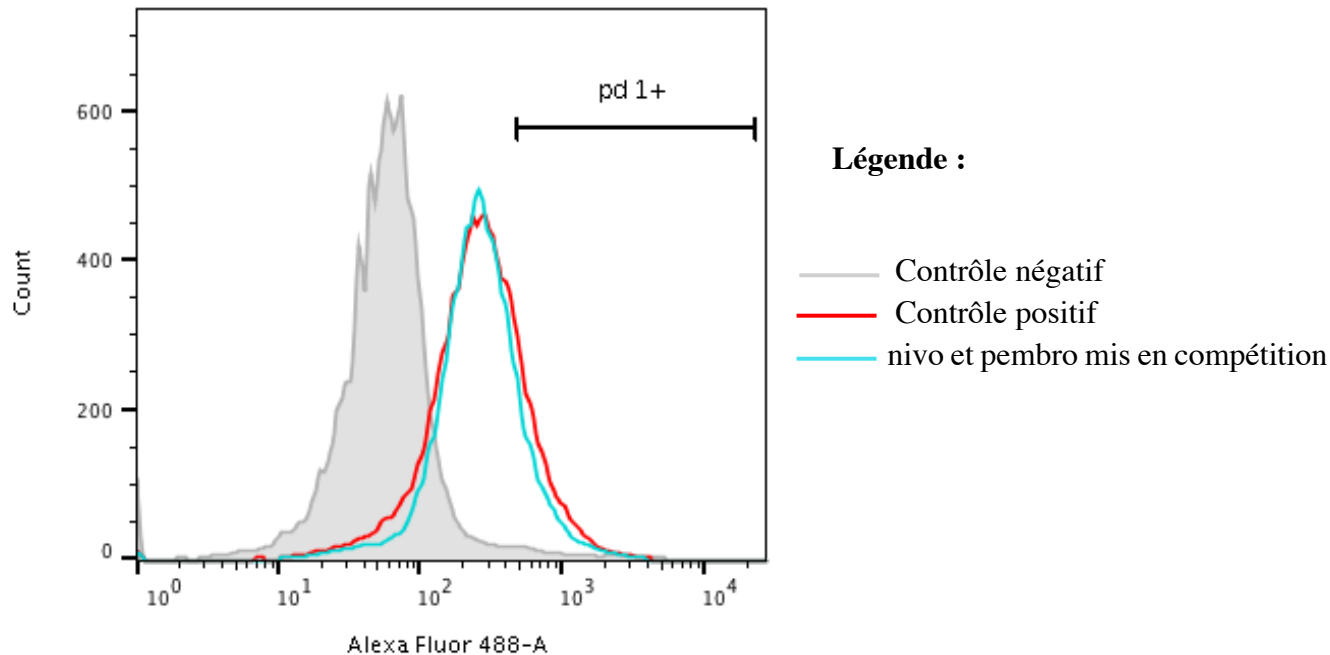
### 3. Étude de l'endocytose du récepteur PD-1 dans les LT humains après liaison au nivolumab et/ou pembrolizumab :

Avant d'étudier l'endocytose de PD-1 dans les LT humains suite à l'engagement de nivo et/ou pembro, nous avons voulu d'abord de caractériser ces deux AcM *in vitro* de point de vue, site de liaison antigénique et affinité vis à vis le récepteur PD-1.

#### 3.1- Caractérisation de nivo et de pembro *in vitro* :

##### ❖ Site de liaison antigénique (épitope) de nivo et de pembro sur la molécule de PD-1 :

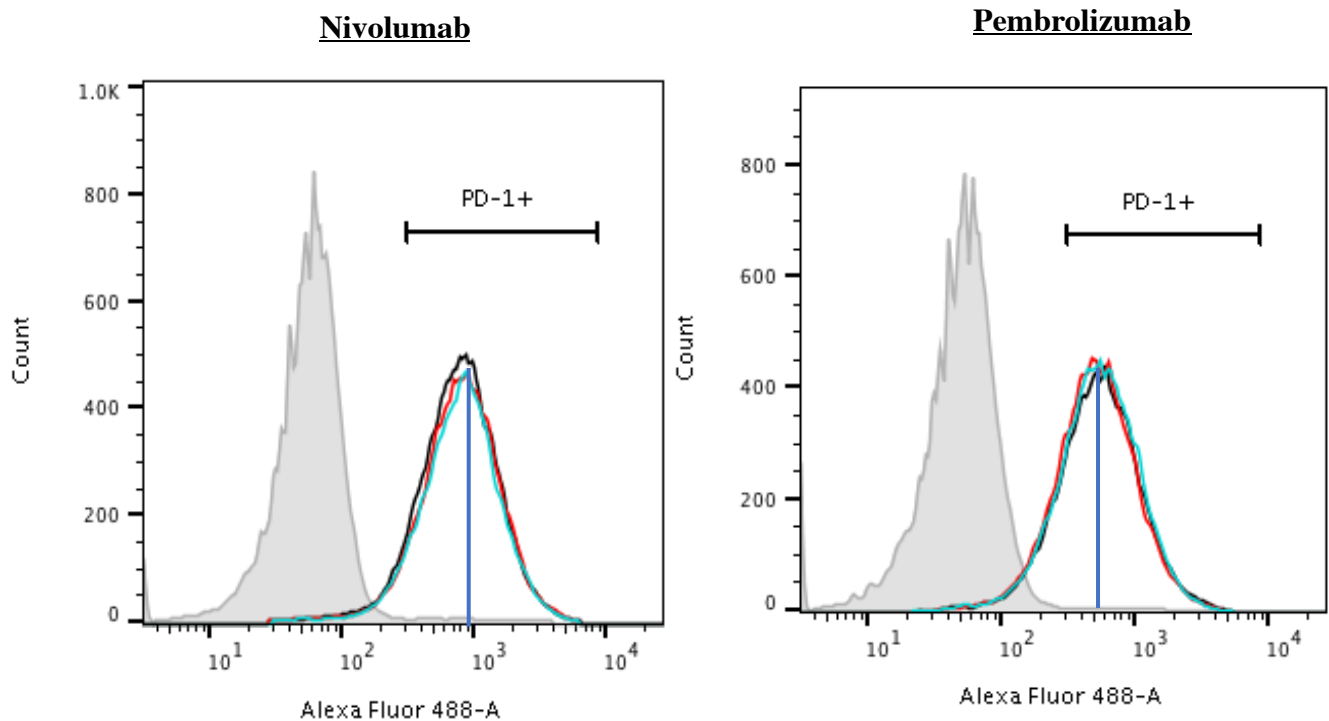
L'analyse par cytométrie en flux a montré qu'il n'y a pas de différence entre la fluorescence de contrôle positif (pembro + Ac secondaire) et le groupe de cellules où nivo et pembro mis en compétition (pembro+ Ac secondaire + nivo), ce qui suggère que nivo ne compétitionne pas avec pembro vis à vis le site de liaison au PD-1. Le nivo et le pembro se lient au PD-1 dans deux domaines différents (deux épitopes différents) (Figure 32).



**Figure 31: Analyse par cytométrie en flux de site de liaison de nivo et de pembro vis à vis le récepteur PD-1 dans les LT humains**

❖ **Affinité de liaison de nivo et de pembro vis à vis le récepteur PD-1 :**

L'analyse par cytométrie en flux a montré que nivo se lie au PD-1 avec une meilleure affinité que celle de pembro, Bien que nivo et pembro se sont liés sur le même nombre de cellules T exprimant le PD-1, nivo semble connaître plus d'épitopes dans la molécule de PD-1 que pembro. L'affinité de ces deux AcM a été évalué avec différentes concentrations ( $1\mu\text{g/ml}$ ,  $5\mu\text{g/ml}$  et  $10\mu\text{g/ml}$ ) de nivo ou pembro, et les mêmes observations ont été trouvées (Figure 33).



**Figure 32: Analyse par cytométrie en flux de l'affinité de nivo et de pembro vis à vis le récepteur PD-1 dans les LT humains**

**Légende :**

- Contrôle négatif : CMN incubées seulement avec l'Ac secondaire
- CMN incubées avec nivo ou pembro à  $1\mu\text{g/ml}$
- CMN incubées avec nivo ou pembro à  $5\mu\text{g/ml}$
- CMN incubées avec nivo ou pembro à  $10\mu\text{g/ml}$



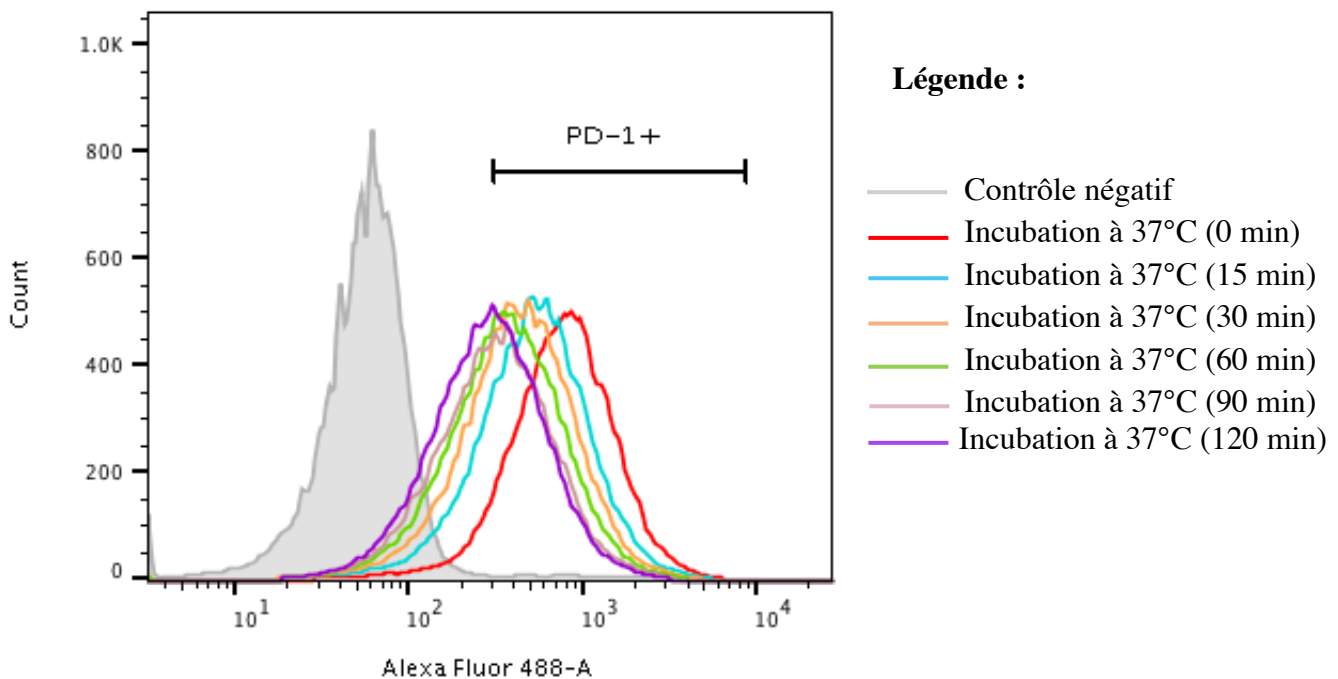
### 3.2- Évaluation de l'endocytose du PD-1 dans les LT humains après liaison au nivo et/ou pembro, en utilisant la méthode de "downmodulation" :

Les LT humains pré-activés ont été incubés avec nivo ou Pembro à 1 $\mu$ g/ml pendant 40 min sur glace. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées à 37°C pendant différent temps. Après chaque temps, les LT ont été lavées à 4°C et incubées avec l'Ac anti-IgG humain conjugué à l'AF488. Cette étape consiste à détecter le complexe PD-1/nivo ou PD-1/pembro présent à la surface des cellules T humaines.

#### 3.2.1- Régulation négative de PD-1 après liaison au nivo dans les LT humains:

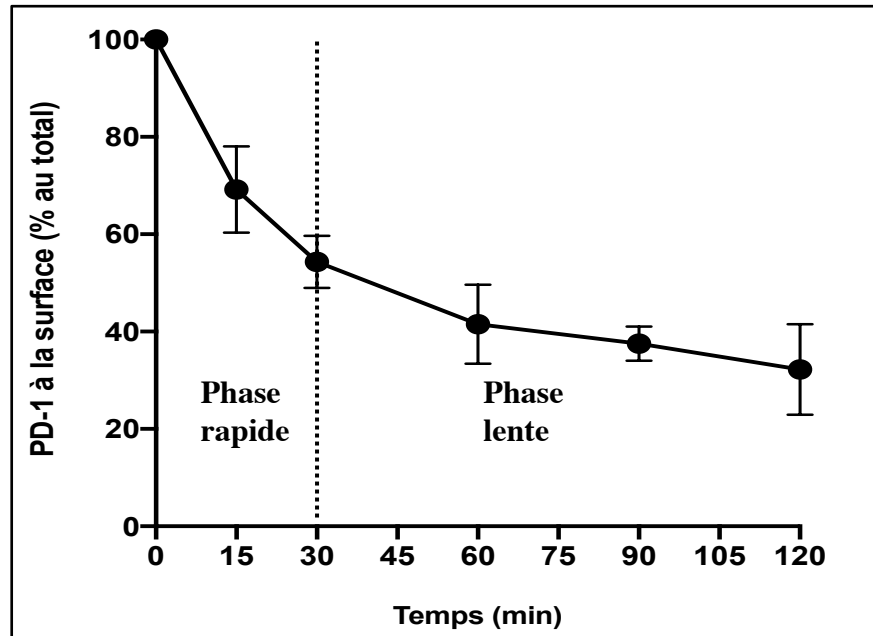
##### a. Analyse par cytométrie en Flux :

Nous avons observé que le signal fluorescent d'Ac AF488-anti-IgG humain diminue progressivement avec le temps d'incubation à 37°C, traduisant par une régulation négative du complexe PD-1/nivo dans les LT humains (Figure 35).



**Figure 33: Analyse par cytométrie en flux de la régulation du complexe PD1/nivo dans les LT humains en fonction de temps (min)**

L'étude du ratio de la MFI des cellules incubées à 37°C par rapport à celle des cellules à  $t_0$  montre qu'il y a une régulation négative rapide du complexe PD-1/nivo, particulièrement dans les 30 premiers minutes, allant de 46% après 30min jusqu'à 68% après 120 min d'incubation (Figure 36).



**Figure 34: Régulation négative moyenne du complexe PD1/nivo dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=5)**

***b. Analyse par Microscopie à fluorescence :***

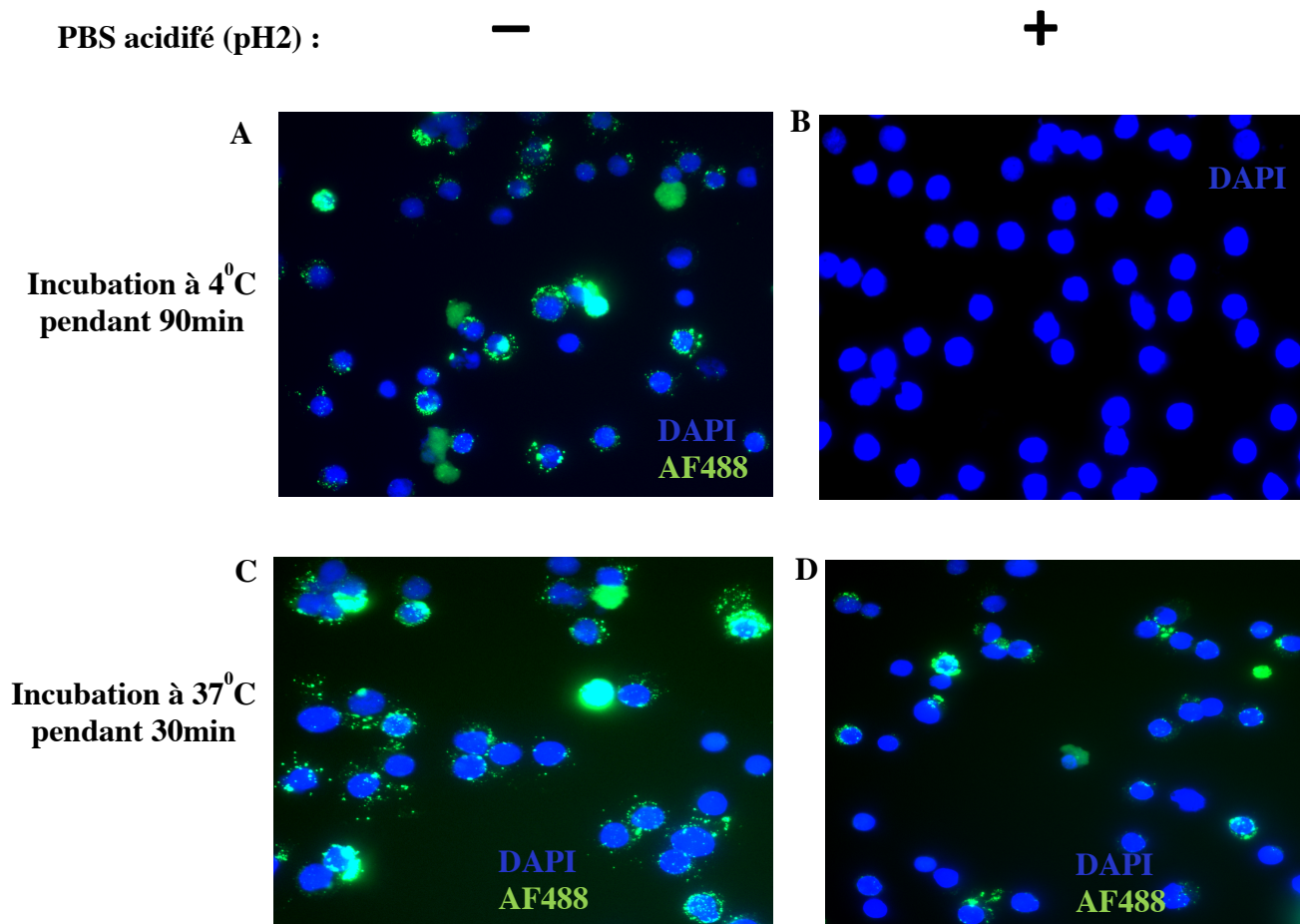
L'endocytose de PD-1 après liaison au nivo dans les LT humains a été étudiée aussi par microscopie à fluorescence (Figure 37). En effet, les LT pré-activées et pré-incubées avec nivo et l'Ac secondaire AF488-anti-IgG humain ont été réparties en quatre conditions :

- Incubation à 4°C pendant 90 min sans traitement par le PBS acidifié (pH=2).
- Incubation à 4°C pendant 90 min avec traitement par le PBS acidifié
- Incubation à 37°C pendant 30 min sans traitement par le PBS acidifié.
- Incubation à 37°C pendant 30 min avec traitement par le PBS acidifié.

Les cellules ont été ensuite fixées avec de la PFA à 2% et centrifugées par cytopspin afin de les déposer sur une lame de verre. Le noyau des cellules a été coloré au DAPI (bleu).

L'analyse par microscopie à fluorescence montre que les LT incubés à 4°C pendant 90 min et traités avec le PBS acidifié présentent un signal fluorescent qui correspond au PD-1 membranaire (non internalisé) (Figure 37A), tandis que les cellules traitées avec PBS (pH2) ne présentent aucune fluorescence signifiant ainsi une élimination complète du complexe nivo/AF488 membranaire (Figure 37B).

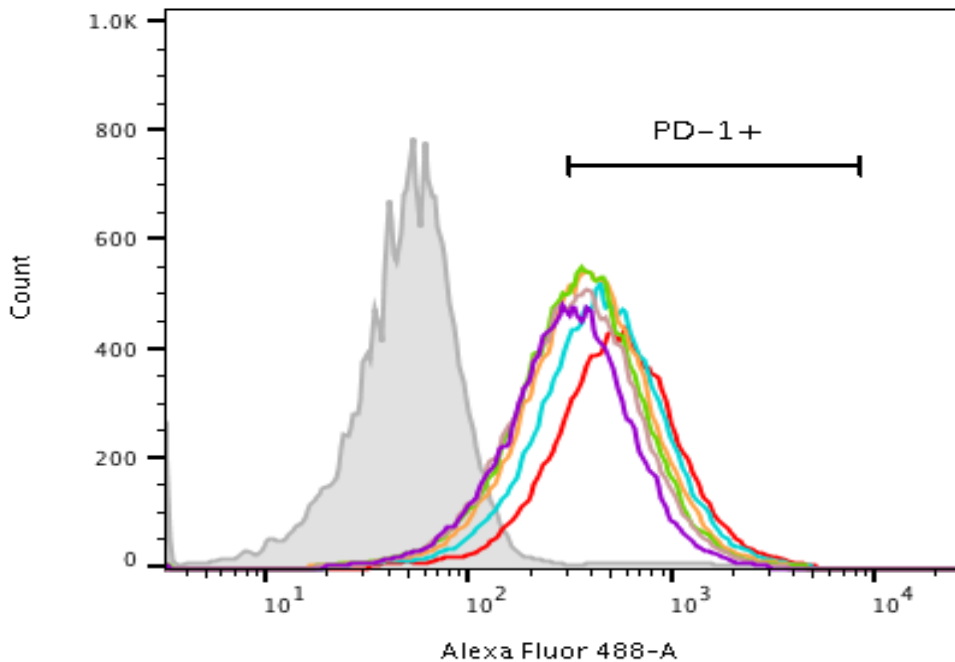
En comparaison avec les cellules incubées à 37°C pendant 30 min sans traitement où la fluorescence est due au présence de PD-1 membranaire et intracellulaire (Figure 37C), les cellules traitées au PBS acidifié présentent aussi une fluorescence due au PD-1 intracellulaire (Figure 37D). Ces observations confirment que la liaison du nivo à PD-1 induit l'internalisation de ce dernier dans les LT humains



**Figure 35: Analyse par microscopie à fluorescence de l'internalisation du récepteur PD-1 après liaison au nivolumab dans les LT humains (grossissement x63)**

### 3.2.2- Régulation négative de PD-1 après liaison au pembro dans les LT humains:

L'analyse par cytométrie en flux a montré qu'il y a diminution progressive de signal fluorescent en fonction de temps d'incubation de LT à 37°C (Figure 38), ce qui indique que la liaison au Pembro induit aussi une régulation négative de PD-1 dans les LT .

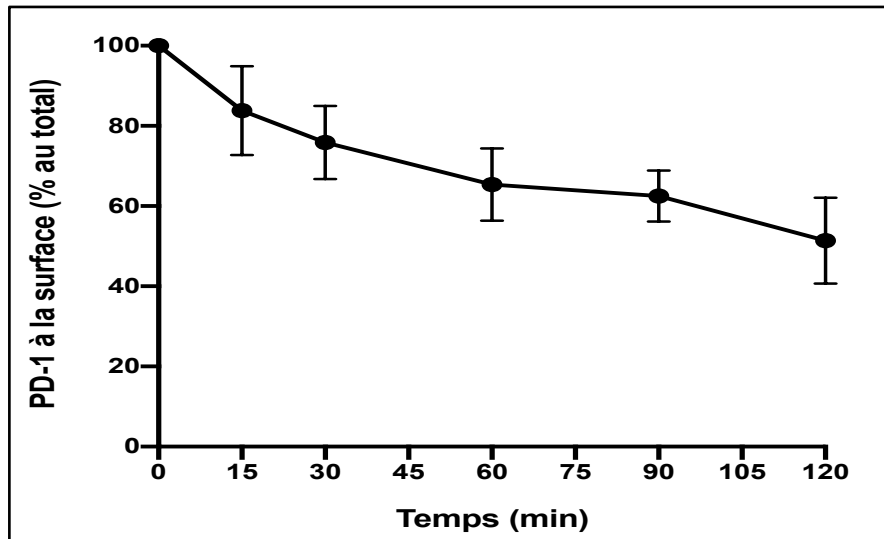


**Figure 36: Analyse par cytométrie en flux de la régulation négative du complexe PD1/pembro dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min)**

#### Légende :

- Contrôle négatif (incubation de CMN avec seulement l'Ac secondaire)
- Incubation à 37°C pendant 0 min
- Incubation à 37°C pendant 15 min
- Incubation à 37°C pendant 30 min
- Incubation à 37°C pendant 60 min
- Incubation à 37°C pendant 90 min
- Incubation à 37°C pendant 120 min

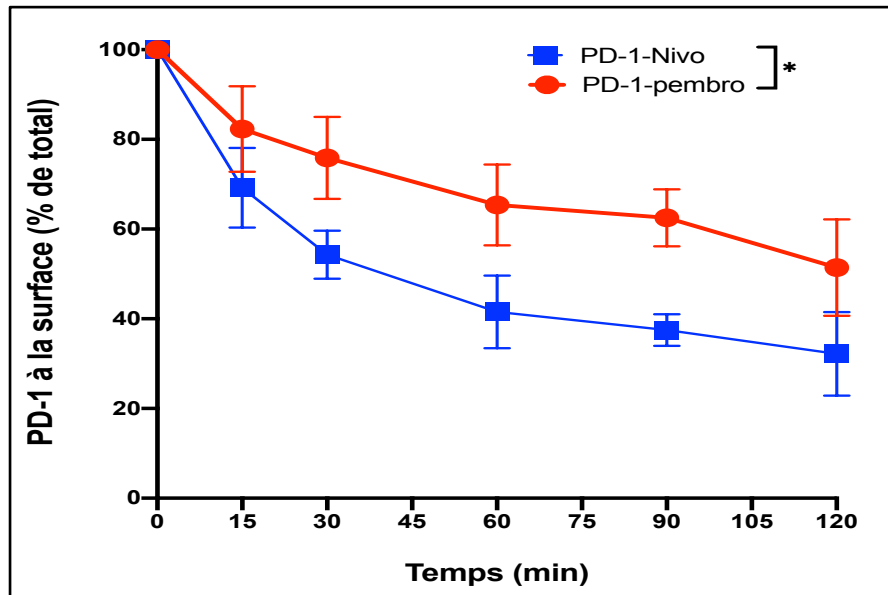
L'étude de ratio de MFI de LT incubés à 37°C par rapport au MFI de cellules à  $t_0$  révèle qu'il y a une régulation négative du complexe PD-1/pembro avec un taux allant de 17% après 15 min jusqu'à 49% après 120 min d'incubation de LT à 37°C (Figure 39).



**Figure 37: Régulation négative moyenne du complexe PD-1/pembro dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=5)**

### ***3.2.3- Comparaison entre la régulation négative de PD-1 après liaison au nivo versus pembro :***

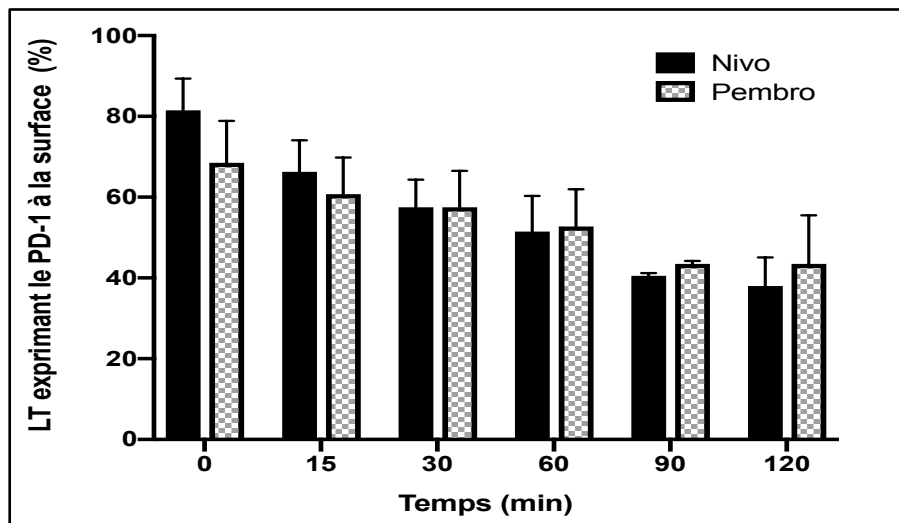
En comparant le taux de régulation négative de complexe PD-1/nivo avec celui de PD-1/pembro (déterminé par le MFI), nous avons trouvé une différence statistiquement significative ( $p=0.03$ ) entre l'endocytose de ce deux complexes dans le LT humains. En effet, suite à la liaison du nivo à PD-1, le taux d'internalisation de PD-1 atteint 60% après 1h d'incubation alors qu'il n'est que de 35% pour le pembro (Figure 40). Ces résultats suggèrent que le nivo pourrait être plus efficace que le pembro.



**Figure 38: Comparaison entre la régulation négative moyenne du complexe PD-1/ nivo versus PD-1/pembro dans le LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=5)**

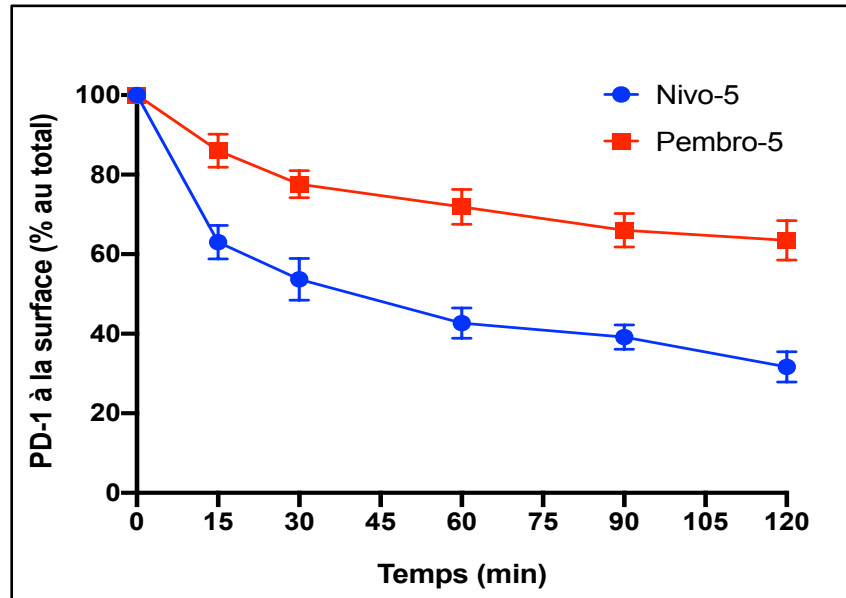
\*p=0.03 par le test T de student non apparié

L'analyse à la base cellulaire montre que la fréquence de LT exprimant le récepteur PD-1 à la surface diminue avec le temps d'incubation à 37°C, cela signifie que ces cellules ont internalisé le récepteur PD-1 après sa liaison au nivo ou pembro (Figure 41).

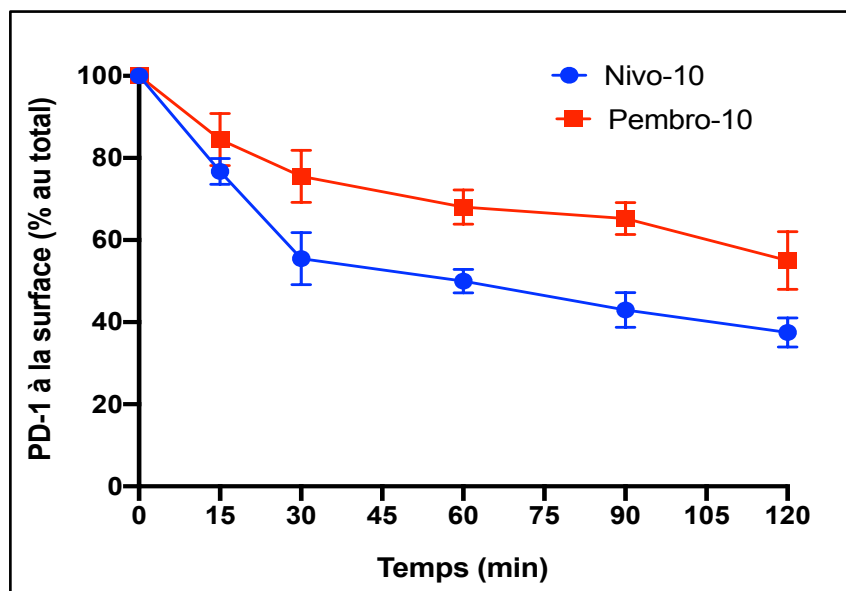


**Figure 39: Fréquence des LT exprimant le récepteur PD-1 à leur surface après liaison au nivo ou pembro en fonction du temps d'incubation (min) (n=5)**

Nous avons également comparé le taux moyen de régulation négative de complexe PD-1/nivo avec celui de PD-1/pembro à des concentrations élevées ( $5\mu\text{g/ml}$  et  $10\mu\text{g/ml}$ ). Les résultats ont montré que le nivo induit une meilleure internalisation de PD-1 que pembro (Figures 42 et 43).



**Figure 40:** Comparaison entre la régulation négative du complexe PD-1/ nivo versus PD-1/pembro dans le LT humains (Concentration de nivo ou pembro= $5\mu\text{g/ml}$ ) (n=3)



**Figure 41:** Comparaison entre la régulation négative du complexe PD-1/ nivo versus PD-1/pembro dans le LT humains (Concentration de nivo ou pembro= $10\mu\text{g/ml}$ ) (n=3)

### 3.2.4- Comparaison entre la régulation négative de PD-1 après liaison au nivo ou pembro ou nivo+pembro

Nous avons voulu savoir si la combinaison de nivo et de pembro favorisait encore une meilleure internalisation de PD-1. Pour cela, les LT humains pré-activés ont été incubés avec nivo ou pembro ou nivo+pembro à  $1\mu\text{g/ml}$  pendant 40 min sur glace. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées à  $37^\circ\text{C}$  pendant différent temps. Après chaque temps, les LT ont été lavées à  $4^\circ\text{C}$  et incubées avec l'Ac AF488-anti-IgG humain.

En comparaison avec nivo seul, la combinaison de nivo+pembro n'a pas amélioré l'internalisation de PD-1 dans les LT humains (Figure 44).

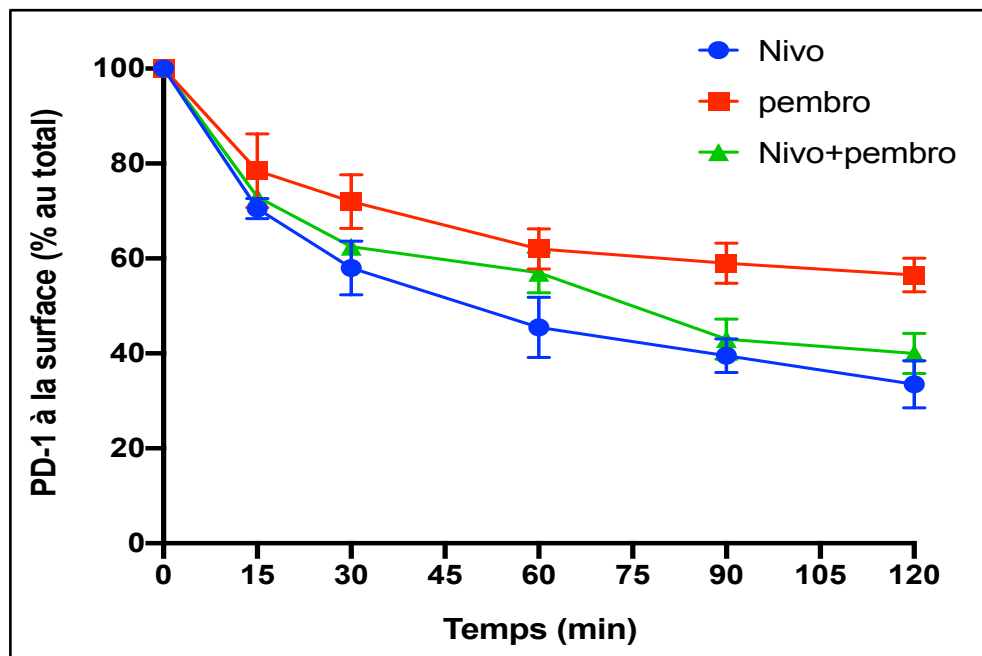


Figure 42: Comparaison entre la régulation négative des complexes PD-1/ nivo versus PD-1/pembro versus PD-1/nivo+pembro dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=3)



#### 4. Identification de la voie impliquée dans l'endocytose de récepteurs PD-1 dans les LT humains:

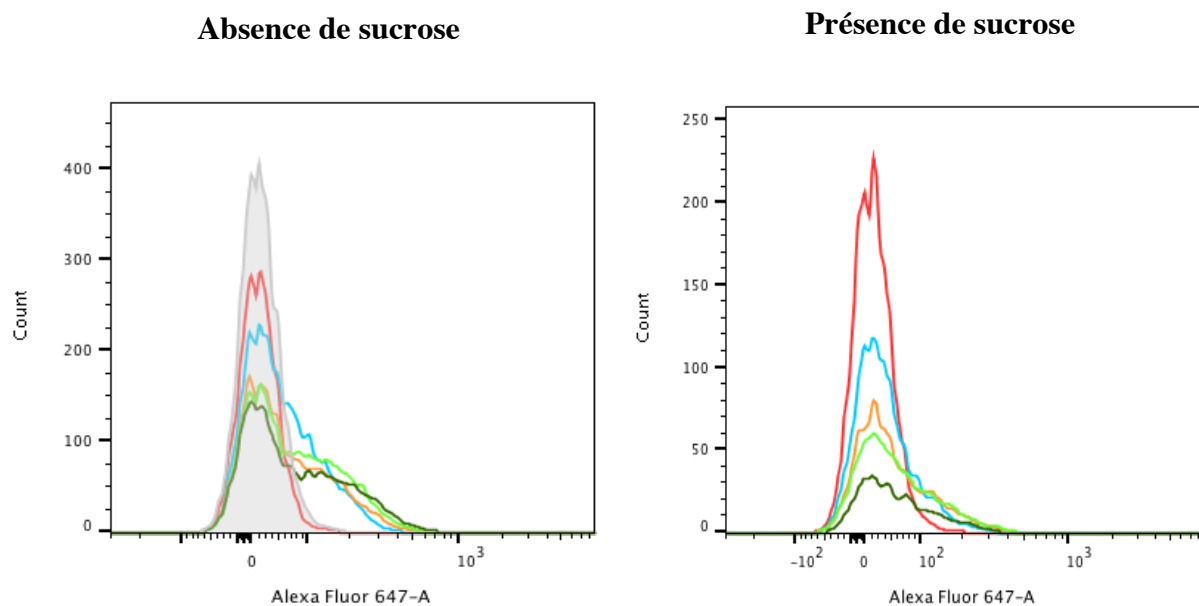
Le mécanisme d'endocytose peut être effectué de manière dépendant ou non des molécules de clathrine. L'endocytose dépendante de la clathrine peut être inhibé en présence d'une concentration élevée de sucrose qui perturbe l'association de la clathrine avec les protéines AP-2.

Afin d'étudier l'effet du sucrose sur l'internalisation du récepteur PD-1, les LT pré-activés et pré-incubés avec l'anti-PD-1 (clone J110) et l'AF647-anti-IgG souris ont été mis en présence d'une solution hypertonique de sucrose (0.45M) ou du milieu de culture de RPMI1640 sans sucrose à 37°C pendant différents temps d'incubation (0, 10, 20, 30 et 60 min).

Après chaque temps, les cellules ont été lavées sur glace et réparties en deux groupes : l'un a été traité avec le PBS acidifié (pH2) et l'autre resté sans traitement.

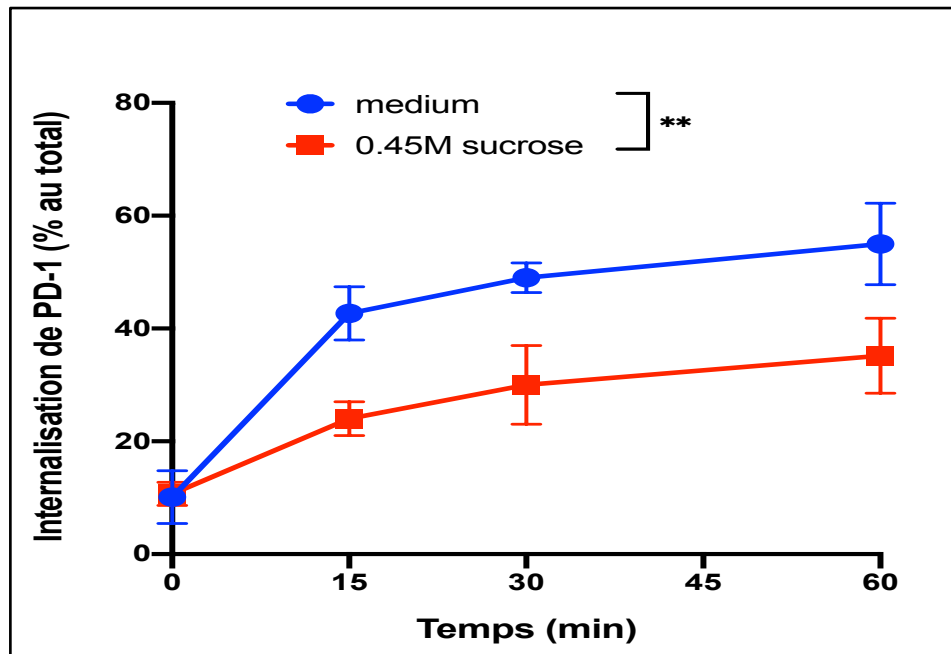
Comme contrôle, Les LT incubés ou non avec du sucrose ont été maintenus sur glace pendant 90 min et traités ou non avec le PBS (pH2).

Comparativement au groupe des cellules incubées dans le milieu de culture RPMI1640 sans sucrose et traitées avec le PBS acidifié, l'analyse par cytométrie en flux a montré une diminution d'internalisation du récepteur PD-1 en présence de sucrose en fonction du temps d'incubation à 37°C (min) (Figure 45).



**Figure 43: Analyse par cytométrie en flux de l'internalisation du récepteur PD-1 dans les LT humains en absence ou présence de sucrose en fonction du temps d'incubation (min)**

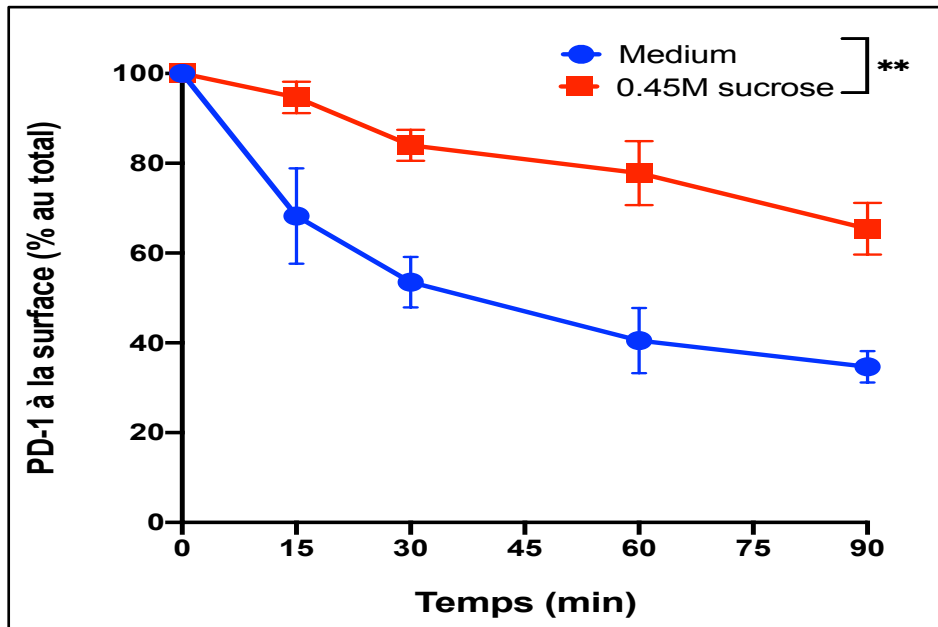
De plus, la comparaison entre le taux d'internalisation de PD-1 en absence et présence de sucrose a révélé une différence statistiquement significative entre ce deux groupes ( $p=0.005$ ) (Figure 46). Ces résultats indiquent que l'incubation des LT humains dans une solution hypertonique de sucrose (0.45M) à 37°C diminue l'internalisation du complexe PD-1, démontrant ainsi que l'endocytose de récepteur PD-1 se fait par voie dépendante de la clathrine.



**Figure 44: Effet du sucrose (0.45M) sur l'internalisation du récepteur PD-1 dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=3)**

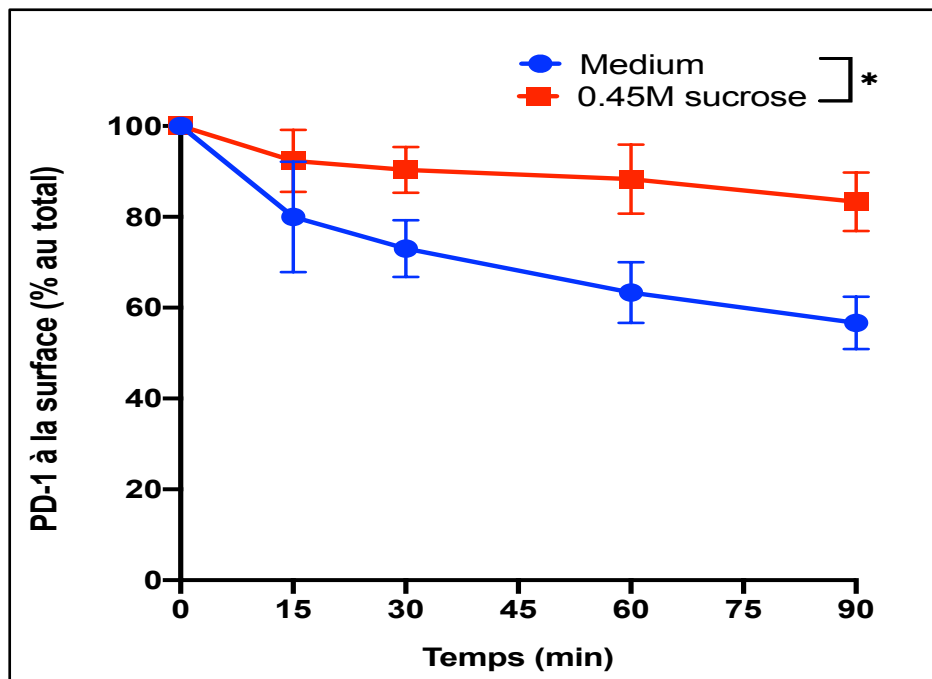
\*\*  $p=0.0051$  par le test T de student non apparié

Aussi, nous avons étudié l'effet de sucrose (0.45M) sur la régulation négative de complexes PD-1/nivo et PD-1/pembro. Comparativement aux résultats obtenus en absence de sucrose, nous avons remarqué que la régulation négative de complexe PD-1/nivo ou PD-1/pembro a diminué significativement ( $p=0.0018$  et  $p=0.02$ , respectivement) suite à l'incubation de LT humains dans une solution hypertonique de sucrose (0.45M). Ces résultats suggèrent que nivo ou pembro induit l'endocytose de PD-1 par voie dépendante de clathrine (Figures 47 et 48).



**Figure 45: Effet de sucrose (0.45M) sur la régulation négative du complexe PD-1/nivo dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=4)**

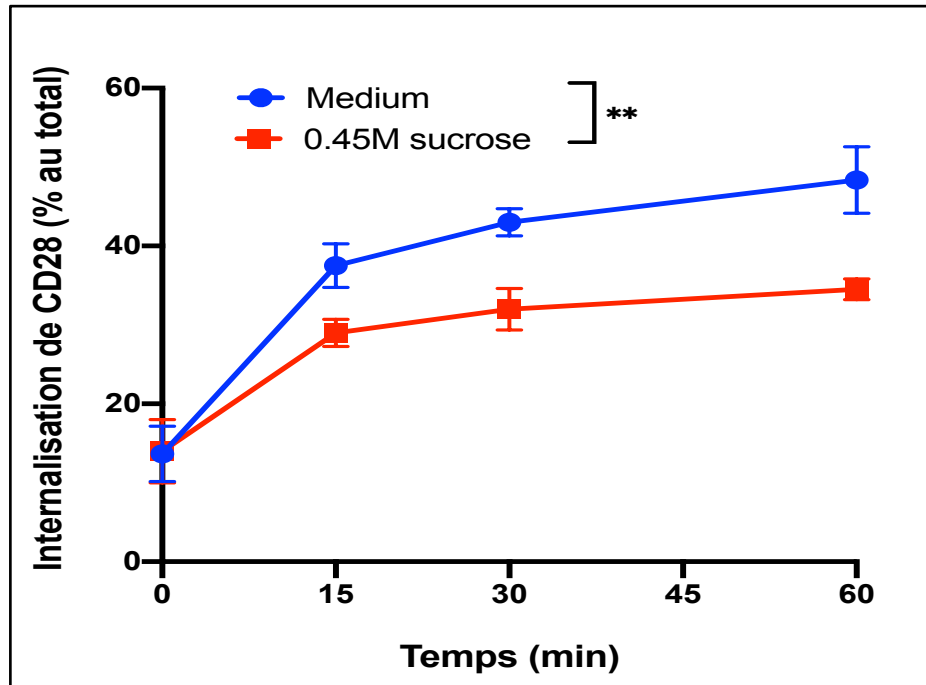
\*\* p=0.0018 par le test T de student non apparié



**Figure 46: Effet de sucrose (0.45M) sur la régulation négative du complexe PD-1/pembro dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=4)**

\*(p=0.02 par le test T de student non apparié)

En plus de récepteur PD-1, nous avons voulu d'étudier l'internalisation du récepteur CD28 dans les LT humains en absence et présence de sucrose (0,45M). L'analyse des résultats indique que le taux d'internalisation de CD28 diminue significativement en présence de la solution hypertonique de sucrose ( $p=0.0033$ ) (Figure 49), démontrant ainsi que l'endocytose de CD28 est en partie dépendante de vésicules de clathrine.



**Figure 47: Effet du sucrose (0.45M) sur l'internalisation de CD28 dans les LT humains en fonction du temps d'incubation (min) (n=3)**

\*\*  $p=0.0033$  par le test T de student non apparié)

## **DISCUSSION**

## **1- Endocytose du PD-1 dans les LT humains après liaison aux Ac anti-PD-1 (clone J110) :**

Les résultats obtenus par la méthode d'internalisation ont montré que le récepteur PD-1 subit un endocytose suite à son engagement aux anticorps anti-PD-1 (clone J110) et que 50 à 56% de la totalité de PD-1 est internalisé entre 30 et 60 minutes respectivement suivant l'incubation de cellules à 37°C. En plus, l'étude de l'internalisation du récepteur CD28 dans les LT humains a montré des résultats similaires avec celle de PD-1 du point de vue taux et cinétique. En effet, 42 à 50% de CD28 est internalisé entre 30 et 60 min respectivement. La similarité entre l'internalisation de PD-1 avec celle de CD28 dans les LT humains suggère que le processus d'endocytose pourrait être conservé dans la famille de CD28. Cependant, une étude menée par Céfaï et ses collègues a montré que le taux d'internalisation de CD28 dans l'hybridome murin DC27.10, transfecté avec le CD28 humain, n'est que 30 à 35% entre 30 et 60 min respectivement (104). La variation des résultats est dépendante d'une part de type de cellule étudié et d'autre part de l'approche utilisé. En effet, Céfaï et al ont adopté la méthode d'internalisation avec approche directe où le récepteur CD28 est lié directement à un Ac anti-CD28 conjugué au fluorochrome, alors que dans notre étude, nous avons utilisé la méthode d'internalisation avec approche indirecte où les récepteurs PD-1 ou CD28 sont liés à un Ac primaire (anti-PD-1 ou anti-CD28 respectivement) et un Ac secondaire anti-IgG de souris conjugué au fluorochrome. À noter que nous avons comparé l'internalisation de PD-1 dans les LT humains par les deux approches (directe et indirecte) et nous avons obtenu des meilleurs résultats avec celle d'indirecte ce qui suggère que le “*crosslinking*” du récepteur PD-1 pourrait améliorer son internalisation.

Par ailleurs, les résultats obtenus par la méthode de “downmodulation” ont montré également que à la suite de l'engagement aux Ac anti-PD-1, il y a régulation négative de PD-1 de surface allant de 40 à 47% entre 30 et 60 min suivant l'incubation de cellules T à 37°C. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec la protéine CD33 qui appartient à la famille des lectines liant l'acide sialique et apparentées aux immunoglobulines Ig (Siglecs) (CD33-related Siglec family) (105).

La concordance des résultats pourrait être expliquée par le fait que la protéine CD33-related Siglec et le récepteur PD-1 partagent les mêmes arrangements de résidus tyrosines dans les motifs de la queue cytoplasmique, ce qui pourrait jouer un rôle important dans le processus d'endocytose.

Toutefois, l'étude de l'endocytose du récepteur CTLA-4 dans la lignée cellulaire CHO et les LT humains a montré que la majorité de CTLA-4 de surface est rapidement internalisé en moins de 5 min suivant l'incubation de cellules à 37°C et que cette internalisation est constitutive (indépendante de l'engagement du récepteur) et dépendante de motifs à base tyrosine YVKM situé dans la queue cytoplasmique du CTLA-4 (106). Bien que les récepteurs PD-1 et CTLA-4 sont connus de délivrer des signaux inhibiteurs pour altérer l'activité de LT, la structure de leur queue cytoplasmique ainsi que leur mécanisme de signalisation sont différentes. Ceci pourrait expliquer la différence entre l'internalisation de ces deux récepteurs et souligne encore l'importance de la structure du queue cytoplasmique dans le processus d'endocytose.

## **2- Caractérisation de nivo et de pembro *in vitro* :**

Après avoir mettre le nivo en compétition avec le pembro vis à vis des CMN exprimant le récepteur PD-1, l'analyse par CF a montré que le site de liaison de nivo au récepteur PD-1 est différent de celui de pembro, ce qui est en accord avec les données de la littérature (61, 71, 72). En effet, dans une étude menée par Tan et al (61), l'analyse cristallographique de l'ectodomaine de PD-1 en complexe avec le fragment Fab du nivo a révélé que ce dernier utilise l'extension N-terminal (boucle N) et les boucles FG et BC de PD-1 comme plate-forme de liaison. Cependant, l'interaction du pembro avec le PD-1 est fortement dépendante de la boucle flexible C'D du PD-1, mais aussi de ses brins F, C et C' (71, 72).

En plus et bien que nous avons trouvé que nivo et pembro se lient au même nombre de LT exprimant le PD-1, l'analyse de l'intensité de fluorescence moyenne obtenue par CF a montré que nivo engage un plus grand nombre de récepteurs que pembro. Cette différence a été observée sur une gamme de concentrations en anticorps (1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  et 10  $\mu\text{g/ml}$ ), ce qui montre encore que nivo et pembro se lient sur des épitopes distincts et que la structure du récepteur PD-1 pourrait être hétérogène à la surface de LT activés.

Dans la littérature, il n'y a pas de données comparatives directes entre nivo et pembro vis à vis le récepteur PD-1, mais des études d'évaluation distinctes ont montré que l'interaction de nivo ou de pembro avec le PD-1 humain est robuste. En effet, une étude *in vitro* menée par Wang et al. a montré que nivo se lie au PD-1 de LT humains avec une forte affinité et que sa constante de dissociation ( $K_d$ ) est de 2,6 nM par la méthode de résonance du plasmon de surface (60).

De plus, l'évaluation pharmacodynamique de nivo *in vitro* a également montré qu'il existe une forte affinité de liaison entre nivo et la PD-1 humaine avec un Kd égal à 3,06 nM déterminé par la même méthode, et que cette affinité dépend de la glycosylation du PD-1 (107). Cependant, Tan et al. ont montré que l'affinité de liaison de nivo à PD-1 ne dépend pas de la glycosylation (61). D'autre part, l'évaluation de l'activité fonctionnelle de pembro *in vitro* a également révélé que le pembro se lie au PD-1 humain avec une forte affinité et que sa constante de dissociation (Kd) est de 27 pM, déterminée par la technique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) (108).

### **3- Endocytose de PD-1 dans les LT humains après liaison au nivo et/ou pembro:**

Bien que nivo et pembro ont montré des résultats puissants dans le traitement de différents types de cancer, aucune étude à ce jour n'a évalué le devenir de la PD-1 de surface après la liaison à ce deux AcM. Le nivo et le pembro sont connus de bloquer l'interaction de PD-1 avec ses ligands PD-L1 et PD-L2, mais la possibilité d'induire une endocytose de PD-1 n'est pas encore déterminée.

Notre étude a montré pour la première fois que la liaison de nivo ou de pembro au récepteur PD-1 induit son endocytose. En effet, nous avons trouvé que suite à l'engagement de nivo, 46% à 68% de PD-1 de surface est internalisé entre 15 min et 2 heures respectivement après l'incubation de LT humains à 37°C. De même, le PD-1 est internalisé suite à l'engagement de pembro avec un taux allant de 25% à 50% entre 30 minutes et 2 heures, respectivement.

De plus, Une analyse comparative de ces deux anticorps a montré une différence statistiquement significative ( $p = 0,03$ ) entre le taux d'internalisation du complexe PD-1 / nivo et celui du complexe PD-1 / pembro (par analyse de l'aire sous la courbe (AUC) et test t de Student non apparié). En effet, en comparaison avec pembro, la liaison de nivo induit une meilleure internalisation de PD-1. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des concentrations élevées de nivo ou de pembro (5 et 10 µg/ml). Nos résultats précédents concernant la meilleure liaison de nivo au récepteur PD-1 sont concordants avec ces observations. En effet, le niveau plus élevé de la liaison de nivo au PD-1 est à son tour compatible avec sa plus grande efficacité à réguler négativement le PD-1 à partir de la surface de LT. Ceci suggère que les récepteurs uniques exprimant l'épitope nivo mais pas l'épitope pembro pourraient être internalisés suite à la liaison d'anticorps.



En se référant aux données des essais cliniques, bien qu'il n'existe pas d'études comparatives directes sur l'efficacité de nivo et de pembro, certaines études ont montré que l'expression de PD-L1 sur les tumeurs pouvait jouer un rôle dans la sélection du traitement par ICI (109). En effet, un essai clinique portant sur l'évaluation de pembro dans le traitement du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) avancé a révélé que le pembro prolongeait la survie globale, en particulier chez les patients présentant une expression élevée de la PD-L1 (> 50%) (75).

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans un autre essai clinique de phase I évaluant l'efficacité de pembro chez des patients atteints de CBNPC avancé et montrant que l'expression de PD-L1 dans au moins 50% des cellules tumorales est corrélée à une amélioration de l'efficacité de pembro (74). Cependant, deux essais cliniques d'évaluation de nivo dans le traitement du CPNPC avancé ont révélé que l'efficacité thérapeutique de nivo est indépendante de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales (58, 110). Il est donc possible que nivo soit plus efficace que pembro dans les tumeurs à faible expression de PD-L1. A l'égard de nos résultats, nous avons trouvé que l'internalisation de PD-1 est plus meilleure avec nivo qu'avec pembro ce qui pourrait expliquer les observations cliniques. Cela suggère que l'endocytose pourrait impliquer dans l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ICI) .

Les analyses cristallographiques des complexes PD-1/ nivo et PD-1/pembro ont montré que nivo et pembro se lient à PD-1 dans deux orientations différentes. Bien que la surface de liaison de nivo sur PD-1 soit proche de celle de pembro, il n'y a pas de chevauchement entre ces deux sites de liaison (61). Ces résultats indiquent la possibilité que l'administration simultanée des deux médicaments puisse améliorer la stratégie thérapeutique, étant donné la capacité des anticorps à bloquer la liaison PD-1 / PD-L1. Cependant, sur la base de nos données, le bénéfice n'était pas visible au niveau de l'internalisation de PD-1 car la combinaison d'anticorps nivo et pembro n'améliorait pas l'endocytose.

Une autre découverte inattendue est que seul un sous-ensemble de molécules PD-1 (50 à 68%) à la surface de LT subit une endocytose. Ceci a été observé avec les trois anticorps anti-PD-1 testés. La base des récepteurs internalisés par rapport à ceux non internalisés pourrait être due à la présence des mécanismes tel que la phosphorylation et l'ubiquitination du queue cytoplasmique de PD-1. En effet, l'étude de l'endocytose de la protéine CD33-related Siglec qui ressemble au PD1

en termes de structure de queue cytoplasmique (les deux molécules ont des arrangements de résidus de tyrosine similaires dans leurs motifs cytoplasmiques, ITIM et ITSM), a montré que la phosphorylation des résidus de tyrosine dans le motif ITIM de la queue cytoplasmique augmente l'internalisation du CD33. Une autre étude récente sur l'endocytose du récepteur de l'insuline (IR) a montré que Shp2 est impliqué dans l'internalisation de l'IR et que l'inhibition de cette phosphatase retarde l'endocytose de l'IR et par la suite améliore la sensibilité à l'insuline chez la souris (111).

En revenant aux membres de la famille PD-1, l'étude de l'endocytose de CTLA-4, un autre co-inhibiteur du récepteur de la LT, est controversée: certaines observations ont montré que les résidus de tyrosine de la phosphorylation de CTLA-4 dans son motif YXXØ interagissaient avec l'AP-2 et stabilise ensuite CTLA-4 à la surface de la LT (112, 113), tandis qu'une autre observation a montré le contraire (106). D'autre part, l'étude de l'endocytose du récepteur CD28 a révélé que la liaison de la protéine PI-3K à la queue cytoplasmique de CD28 améliore son internalisation (104).

Un autre mécanisme pourrait impliquer dans l'endocytose de PD-1, c'est l'ubiquitination. En effet, une étude menée sur le récepteur de l'EGF a montré que l'ubiquitination de ce dernier par l'ubiquitine ligase Cbl-b favorise le recrutement de protéines régulatrices telles que l'epsin-1 et l'epsin-15 au niveau des sites d'ubiquitination, ce qui induit l'internalisation de l'EGFR par voie dépendante de clathrine (97). Cependant, d'autres récepteurs de tyrosine kinase, tels que le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR), n'impliquent pas le mécanisme d'ubiquitination pour leur endocytose (114).

Concernant le récepteur PD-1, il a été démontré que les deux ligases E3 Cbl-b et E3 FBX038 interviennent dans l'ubiquitination de PD-1 dans deux sites distinctes, K-233 et K-210. Cependant, il reste à déterminer si la ligase FBX038 est le principal moteur de la réponse à l'ubiquitination ou si Cbl-b et FBX038 coopèrent ensemble (115, 116).

Une autre implication est que la liaison des microtubules ou du cytosquelette d'actine pourrait influencer le processus d'endocytose de PD-1.

Toutes ces observations restent à déterminer afin d'élucider le mécanisme impliqué dans l'endocytose de PD-1 après son engagement au niveau du pembro. Il est possible que l'induction d'un plus grand nombre de récepteurs à l'endocytose augmente l'efficacité des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires dans le traitement du cancer.

En outre, l'étude de la dégradation ou du recyclage de PD-1 en surface pourrait donner un mécanisme clair sur le devenir de PD-1 après son engagement au nivo et pembro. Nos résultats préliminaires (données non mentionnées) d'une seule expérience ont montré qu'il existe une dégradation mais pas de recyclage de PD-1 à la surface de LT. Ces données restent à confirmer par d'autres expériences. Concernant le récepteur CD28, Céfal et al ont montré qu'après l'internalisation, 50% du récepteur CD28 est dégradé par voie des lysosomes alors que le reste de 50% est recyclé à la surface suite au traitement de cellules au chloroquine, un inhibiteur de la dégradation par les lysosomes (104).

#### **4- Voie impliquée dans l'endocytose de PD-1 :**

L'internalisation des récepteurs membranaires peut se faire par voie dépendante ou indépendante des vésicules de clathrine. Afin de déterminer la voie impliquée dans l'endocytose de PD-1, nous avons incubé nos cellules dans une solution hypertonique de sucrose. Le sucrose est connu comme inhibiteur de l'endocytose par voie dépendante de clathrine (EDC) puisque il perturbe l'association de la molécule adaptatrice AP-2 avec les molécules de clathrine. Nos résultats ont montré que l'utilisation de sucrose à une forte concentration (0.45M) inhibe l'internalisation de PD-1. En effet, nous avons trouvé une différence statistiquement significative entre l'internalisation du complexe PD-1/nivo en absence et en présence de sucrose ( $p=0.0014$ ). Aussi, l'endocytose du complexe PD-1/pembro est bloqué en présence du sucrose. Ces observations suggèrent que l'internalisation de PD-1 se fait par voie dépendante de clathrine, ce qui concorde avec les résultats des récepteurs CD28 (104) et CTLA-4 (106). Par ailleurs, l'utilisation des autres inhibiteurs de l'EDC comme la chlorpromazine et le dynasore (inhibiteur de l'activité GTPase de la dynamine) serait nécessaire pour confirmer nos résultats.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

PD-1 (*Programmed cell death protein-1*) est un récepteur co-inhibiteur exprimé à la surface de LT activés. Ce récepteur joue un rôle important dans le maintien de la tolérance périphérique tout en protégeant contre les maladies auto-immunes et inflammatoires (2). Cependant, une expression élevée et permanente de PD-1 et ses ligands PD-L1 et PD-L2 (PD-Ls) perturbe la réponse immunitaire de LT contre les pathogènes et les cellules tumorales.

Les cellules tumorales sont capables d'échapper au système immunitaire notamment en surexprimant les ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2. L'interaction de PD-1, exprimé sur les LT infiltrant la tumeur, avec ses ligands inhibe la réponse anti-tumorale de LT ce qui conduit à la progression et l'invasion du cancer (6).

Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ICI) ciblant l'axe PD-1/PD-Ls par des anticorps monoclonaux (AcM) représentent aujourd'hui une avancé majeur dans le traitement de différents types de cancer, tant sur le plan de l'efficacité que de la tolérance. Bien que les traitements classiques, comme la chimiothérapie et la thérapie ciblée agissent directement sur les cellules cancéreuses, les ICI réactivent la réponse immunitaire anti-tumorale en perturbant la signalisation co-inhibitrice des LT.

Le nivolumab (nivo) et le pembrolizumab (pembro) sont deux AcM anti-PD-1 qui bloquent l'interaction de PD-1 avec ses ligands. Ces AcM ont montré des résultats prometteurs dans le traitement de multiples types de cancers comme le mélanome, le cancer bronchique non à petites cellules et le carcinome à cellules rénales, tout en favorisant des réponses durables chez certains patients.

Malgré leur importance en immunothérapie, aucun travail n'a étudié la possibilité de l'endocytose de PD-1 après la liaison au nivo ou pembro. Ceci est important car les niveaux d'expression du PD-1 sur les LT et le devenir des complexes PD-1/nivo ou PD-1/pembro peuvent déterminer l'efficacité thérapeutique de ce deux AcM dans le traitement du cancer.

Notre étude a montré que la liaison de nivo et de pembro au PD-1 induit son endocytose dans les LT humains. En effet, suite à l'engagement de nivo, 46% à 68 % de PD-1 de surface est internalisé entre 30 min et 2 heures respectivement suivant l'incubation de LT humains à 37°C.

De même, le PD-1 est internalisé suite à son engagement au pembro avec un taux allant de 25% à 50% entre 30 min et 2 heures respectivement.

L'analyse comparative de ce deux anticorps a montré une différence statistiquement significative entre le taux d'internalisation du complexe PD-1/nivo et celui du PD-1/pembro : la liaison de nivo induit une meilleure internalisation de PD-1 même à des concentrations élevées de pembro.

En clinique, la plus grande efficacité de nivo dans le cas où la PD-L1 est exprimée à de faibles niveaux pourrait s'expliquer par des différences dans l'élimination de PD-1 de la surface cellulaire. Cela était dû en partie à la liaison de nivo à un plus grand nombre de récepteurs, mais également à un niveau élevé de récepteurs internalisés.

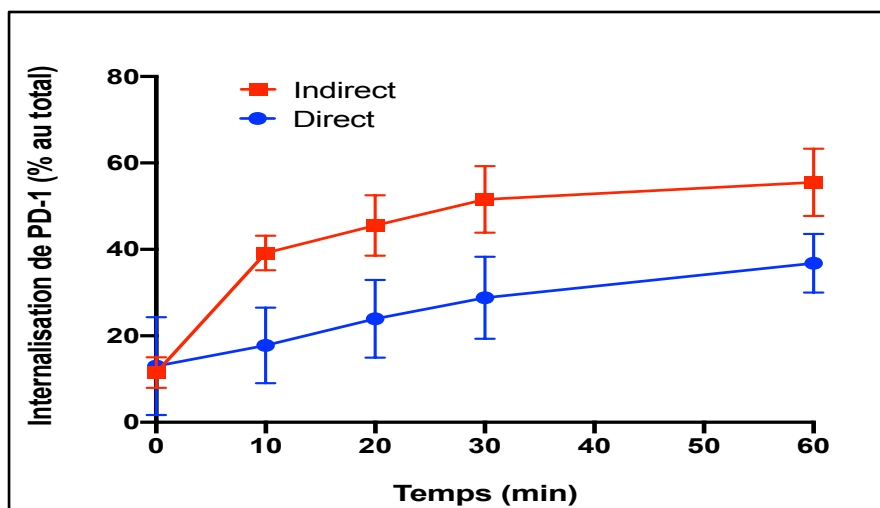
En outre, nous avons trouvé que l'endocytose de PD-1 est inhibé en présence d'une solution hypertonique de sucrose, connu comme inhibiteur de l'endocytose par vésicules de clathrine (EDC). L'internalisation de PD-1 se fait donc par voie dépendante de clathrine, mais l'utilisation des autres inhibiteurs serait nécessaire pour confirmer ces observations.

Bien que les ICI comme nivo et pembro sont connus de bloquer l'interaction de PD-1 avec ses ligands, PD-L1 et PD-L2, notre étude a montré pour la première fois que ce deux AcM induisent aussi l'endocytose du récepteur PD-1 dans les LT humains. Aujourd'hui, deux mécanismes interviennent lors de l'engagement de nivo ou pembro avec le PD-1, blocage et internalisation. L'implication de processus de l'endocytose dans l'efficacité thérapeutique de nivo et de pembro sera évalué sur des patients avec cancer répondeurs versus non répondeurs à ce traitement.

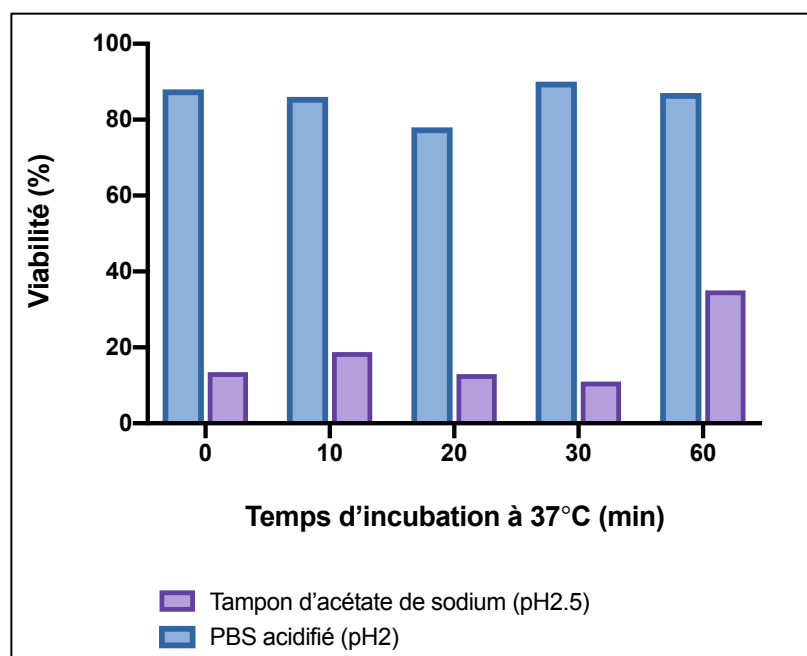
Cependant, nos résultats ont montré que seulement une fraction de PD-1 est internalisée. La différence entre les formes susceptibles et les formes résistantes à l'internalisation pourrait être due à la présence des mécanismes impliquant dans le processus d'endocytose comme la phosphorylation et l'ubiquitination du queue cytoplasmique du PD-1. L'identification de ces mécanismes pourrait être exploité pour améliorer l'internalisation de PD-1 dans les LT et par la suite augmenter les potentiels thérapeutiques de nivolumab et de pembrolizumab dans le cancer.

## **FIGURES SUPPLÉMENTAIRES**

**Figure S1 : Comparaison entre l'internalisation du récepteur PD-1 dans les LT humains par approche directe et indirecte**

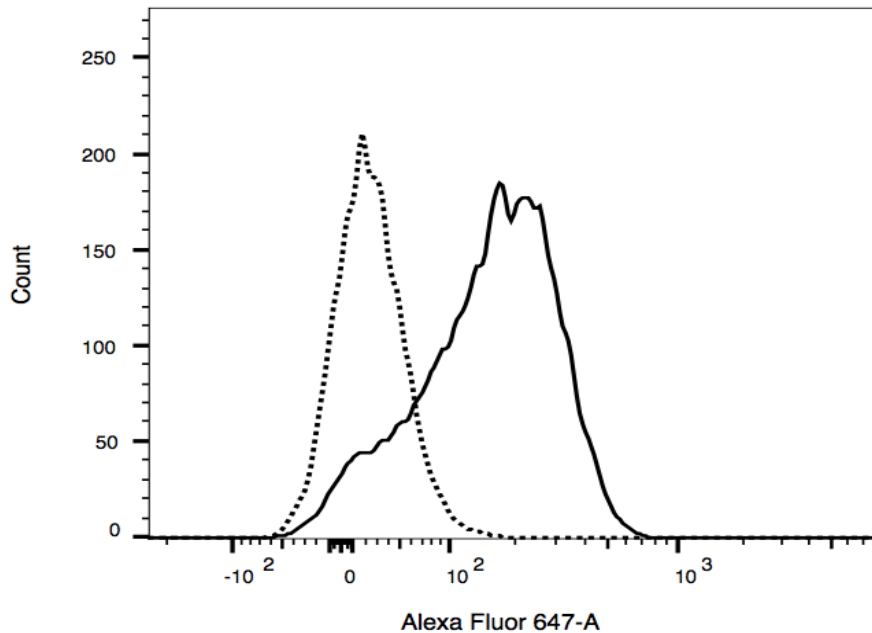


**Figure S2 : Effet de tampon d'acétate de sodium (pH2.5) et de PBS acidifié (pH2) sur la viabilité de LT humains**



Le traitement des CMN avec la solution de PBS acidifiée n'a pas altéré la viabilité de ces cellules, contrairement au traitement par le tampon d'acétate de sodium (pH 2.5).

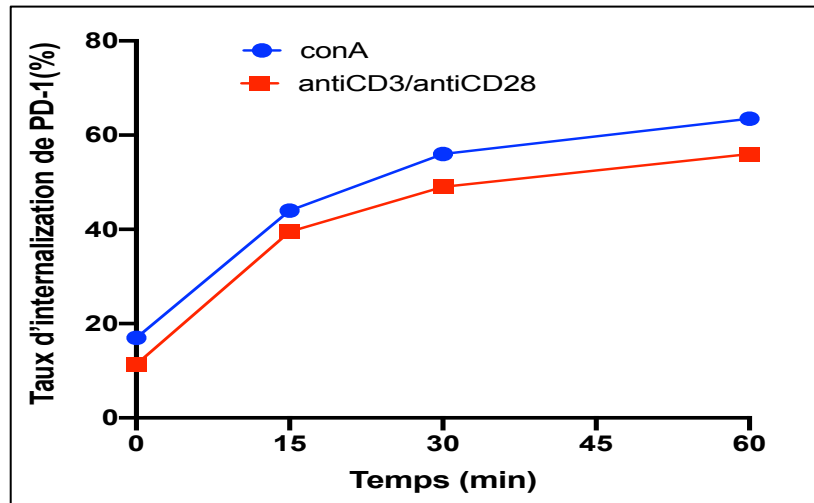
**Figure S3 : Analyse par cytométrie en flux de la fluorescence de LT humains incubés à 4°C pendant 90min et traités (ligne discontinue) ou non traités (ligne continue) par la solution de PBS acidifié (pH2)**



L'efficacité de la solution de PBS acidifié (pH2) dans l'élimination du complexe anti-PD-1/AF647-anti-IgG non internalisé a été étudiée : les CMN, pré-activées et pré-incubées avec l'Ac anti-PD-1 humain et AF647-anti-IgG, ont été mises à 4°C pendant 90min. Un groupe de ces cellules a été maintenu sur glace sans traitement (Figure S4, ligne continue), il représente l'expression initiale de PD-1 alors qu'un autre a été traité avec la solution de PBS acidifiée (pH2) (Figure S4, ligne discontinue), il contrôle l'efficacité de l'élimination de complexe non internalisé.

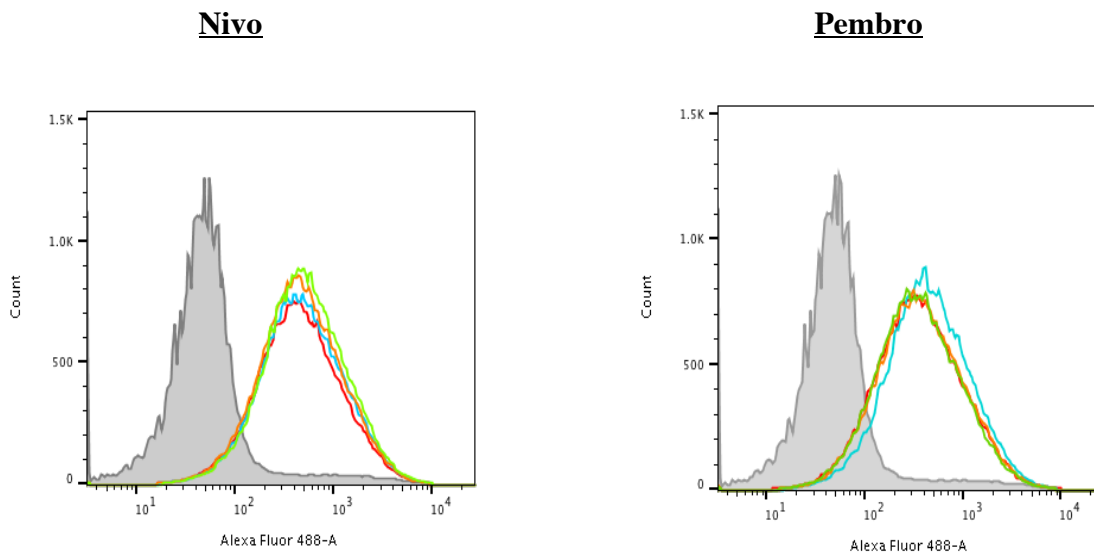


**Figure S4 : Taux d'internalisation du PD-1 dans des LT humains activées par antiCD3/antiCD28 (3 $\mu$ g/ml/2 $\mu$ g/ml) ou par conA (10 $\mu$ g/ml)**



Pas de différence entre le taux d'internalisation de PD-1 dans les LT activés par CD3/CD28 ou par conA.

**Figure S5 : Liaison de nivo ou de pembro sur le récepteur PD-1 de LT humains en fonction de différentes concentrations (0.5, 1, 2 et 5 $\mu$ g/ml)**



Les données ont montré que les différentes concentrations de Nivo ou de Pembro n'ont pas d'effet sur leur liaison sur le récepteur PD-1. Par conséquent la concentration de 1 $\mu$ g/ml pour Nivo et pour pembro a été considérée comme concentration optimale.

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13.
2. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18.
3. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea Karine M, Breckpot GK, Escors D. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*. 2017;Vol. 8.
4. Jiabei H, Ying H, Mingming H, Baolan L. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Nature Scientific Reports*. 2015;DOI: 10.1038/srep13110.
5. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nature Immunology*. 2013;14(12).
6. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews, Drug Discovery*. 2019;18.
7. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018(359):1350-5.
8. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. *Immunology Review*. 2010(236):219-42.
9. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Frontiers in Immunology*. 2016;7(550).
10. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nature Reviews* 2016;16:566-76.
11. Sharpe AH, Freeman GJ. THE B7-CD28 SUPERFAMILY. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2.
12. Freeman GJ. Structures of PD-1 with its ligands: Sideways and dancing cheek to cheek. *PNAS*. 2008;105(30):10275-6.
13. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO*. 1992;11(11):3887-96.
14. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11:141-51.
15. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunology*. 2007;19(7):813-24.
16. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *TRENDS in immunology*. 2006;27(4):195-201.

17. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunology Review*. 2009;229(1):114-25.
18. Chamoto K, Al-Habsi M, Honjo T. Role of PD-1 in Immunity and Diseases. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2017(410):75-97.
19. Taylor A, Harker JA, Chanthong K, Stevenson PG, Zuniga EI, Rudd CE. Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation Drives T-bet-Mediated Downregulation of Co-receptor PD-1 to Enhance CD8+ Cytolytic T Cell Responses. *Immunity*. 2016;44:274-86.
20. Taylor A, Rudd CE. Commentary: Small Molecule Inhibition of PD-1 Transcription is an Effective Alternative to Antibody Blockade in Cancer Therapy. *J Immunol Sci*. 2019;3(1):9-12.
21. McPherson RC, Konkel JE, Prendergast CT, Thomson JP, Ottaviano R, Leech MD, et al. Epigenetic modification of the PD-1 (Pdc1) promoter in effector CD4+ T cells tolerized by peptide immunotherapy. *eLife* 2014;3:1-20.
22. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *JExpMed*. 2000;192(7):1027-34.
23. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*. 2001;2(3).
24. Tseng S-Y, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells. *J Exp Med*. 2001;193:839-45.
25. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity review*. 2018;48:434-52.
26. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2004;945-54.
27. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med*. 2011;209:1201-17.
28. Sheppard K-A, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3f signalosome and downstream signaling to PKCh. *FEBS letter*. 2004;574:37-41.
29. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science*. 2017;355:1428-33.
30. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, Yang S, Zhang R, Barber DL, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science*. 2017;355:1423-7.
31. Mizuno R, Sugiura D, Shimizu K, Maruhashi T, Watada M, Okazaki I-m, et al. PD-1 Primarily Targets TCR Signal in the Inhibition of Functional T Cell Activation. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.

32. Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ, Sharpe AH. Programmed Death-1 (PD-1):PD-Ligand 1 Interactions Inhibit TCR Mediated Positive Selection of Thymocytes. *Journal of Immunology*. 2005;175(11):7372–9.
33. Blank C, Brown I, Marks R, Nishimura H, Honjo T, Gajewski TF. Absence of Programmed Death Receptor 1 Alters Thymic Development and Enhances Generation of CD4/CD8 Double-Negative TCR-Transgenic T Cells. *The Journal of Immunology*. 2003;4574-81.
34. Wang J, Yoshida T, Nakaki F, Hiai H, Okazaki T, Honjo T. Establishment of NOD-Pdcd1/ mice as an efficient animal model of type I diabetes. *PNAS*. 2005;102.
35. Ansari MJI, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H, et al. The Programmed Death-1 (PD-1) Pathway Regulates Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic (NOD) Mice. *J Exp Med*. 2003;198:63-96.
36. Dong H, Strome SE, Matteson EL, Moder KG, Flies DB, Zhu G, et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;111:363-70.
37. Giancchetti E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2013;12:1091–100.
38. Prokunina L, Castillejo-López C, Öberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *nature genetics*. 2002;32.
39. Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, Faire Ud, Wiman Br, Prince J, et al. Association of the PD-1.3A Allele of the PDCD1 Gene in Patients With Rheumatoid Arthritis Negative for Rheumatoid Factor and the Shared Epitope. *Arthritis & Rheumatism*. 2004;50:1770-3.
40. Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. 2003;62:492-7.
41. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Ma'urer M, et al. A PD-1 Polymorphism Is Associated with Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2005;58:50-7.
42. Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *PNAS*.101:16004–9.
43. Barber DL, Wherry J, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439:682-7.
44. D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG, Lozupone C, Dillon S, Meditz A, et al. Programmed Death 1 Expression on HIV-Specific CD4 + T Cells Is Driven by on Viral Replication and Associated with T Cell Dysfunction. *The Journal of Immunology*. 2007;179:1979-87.
45. Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 Expression on Circulating and Intrahepatic Hepatitis C Virus-Specific CD8 T Cells Associated with Reversible Immune Dysfunction. *American Society for Microbiology*. 2007.

46. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell- based immunotherapy. *Nature Reviews | Clinical Oncology*. 2019;16.
47. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* 2015;27.
48. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;12(4): 252–264. doi:10.1038/nrc3239.
49. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *PNAS*. 2002;99.
50. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *Journal of Biomedical Science*. 2017.
51. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2014.
52. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *BRITISH JOURNAL OF CANCER*. 2018;DOI:10.1038/bjc.2017.434.
53. Sharma P, Wagner K, Wolchok JD, Allison JP. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nature Reviews cancer*. 2011;11.
54. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY*.348(6230).
55. Du X, Tang F, Liu M, Su J, Zhang Y, Wu W, et al. A reappraisal of CTLA-4 checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Nature*. 2018(28:416–432).
56. F. Stephen Hodi MD, Steven J. O'Day MD, David F. McDermott MD, Robert W. Weber MD, Jeffrey A. Sosman MD, John B. Haanen MD, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2010;363.
57. Guo L, Zhang H, Chen B. Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor. *Journal of Cancer*. 2017;8.
58. Brahmer JR, Hammers H, Lipson EJ. Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity. *Future Oncol*. 2015;11(9).
59. Chinai JM, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015;36.
60. Wang C, Thudium KB, Han M, Wang X-T, Huang H, Feingersh D, et al. In Vitro Characterization of the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab, BMS-936558, and In Vivo Toxicology in Non-Human Primates. *CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY*. 2014;2(9).
61. Tan S, Zhang H, Chai Y, Song H, Tong Z, Wang Q, et al. An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. *NATURE COMMUNICATIONS*. 2016;DOI: 10.1038/ncomms14369.

62. Fessas P, Lee H, Ikemizu S, Janowitz T. A molecular and preclinical comparison of the PD-1–targeted T-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab. *Seminars in oncology*. 2017;44:136-40.
63. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(26).
64. Caroline Robert MD, Ph.D., Georgina V. Long MD, Ph.D. , Benjamin Brady MD, Caroline Dutriaux MD, Michele Maio MD, Laurent Mortier MD, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *The New England Journal of Medicine*. 2019;372:4.
65. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. 2015.
66. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2015;doi:10.1056/NEJMoa1507643.
67. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18.
68. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet Oncol*. 2017;389: 2492–502.
69. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Matsumura.. N. Abstract: Efficacy and safety of anti-PD-1 antibody (Nivolumab: BMS-936558, ONO-4538) in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Journal of clinical oncology*.
70. Constantinidou A, Alifieris C, Trafalis DT. Targeting Programmed Cell Death -1 (PD-1) and Ligand (PD-L1): A new era in cancer active immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018;194.
71. Na Z, Yeo SP, Bharath SR, Bowler MW, Esra Balıkcı, Wang C-I, et al. Structural basis for blocking PD-1-mediated immune suppression by therapeutic antibody pembrolizumab. *Cell Research*. 2017.
72. Horita S, Nomura Y, Sato Y, Shimamura T, Iwata S, Nomura N. High-resolution crystal structure of the therapeutic antibody pembrolizumab bound to the human PD-1. *Scientific Reports*. 2016;6.
73. Schachter J, Ribas A, Long GV, Arance A, Grob J-J, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study *The Journal of Clinical Investigation*. 2017;390.
74. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2015;372(2018-2028).
75. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han J-Y, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016;387.

76. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2016;375.
77. Balar A, Bellmunt J, O'Donnell AH, Castellano D, Grivas P, Vuky J, et al. Pembrolizumab (pembro) as first-line therapy for advanced/unresectable or metastatic urothelial cancer: Preliminary results from the phase 2 KEYNOTE-052 study. *European Society for Medical Oncology*. 2016.
78. Chen R, Zinzani PL, Fanale MA, Armand P, Johnson NA, Brice P, et al. Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. *American Society of Clinical Oncology*. 2017;35.
79. Fuchs CS, Doi T, Jang RW-J, Muro K, Satoh T, Machado M. Abstract: KEYNOTE-059 cohort 1: Efficacy and safety of pembrolizumab (pembro) monotherapy in patients with previously treated advanced gastric cancer. *Journal of clinical oncology*
80. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discovery*. 2018.
81. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature review | MOLECULAR CELL BIOLOGY*. 2018;19:313-26.
82. Haucke V, Kozlov MM. Membrane remodeling in clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Science*. 2018;131.
83. R.Maxfield F, E.McGraw T. ENDOCYTIC RECYCLING. *Nature Reviews, Molecular cell biology*. 2004;5:121-32.
84. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Review, Molecular Cell Biology*. 2011;12:517-33.
85. Lampe M, Vassilopoulos S, Merrifield C. Clathrin coated pits, plaques and adhesion. *Journal of Structural Biology*. 2016;196:48-56.
86. Madhus IH, Stang E. Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *Journal of Cell Science*. 2009;122(19).
87. Mayle KM, Le AM, Kamei DT. The Intracellular Trafficking Pathway of Transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):264-81.
88. Henne WM, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R, et al. FCHo Proteins Are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis. *SCIENCE*. 2010;328:1281-4.
89. Ungewickell EJ, Hinrichsen L. Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007;19:417-25.
90. Smith SM, Baker M, Halebian M, Smith CJ. Weak Molecular Interactions in Clathrin-Mediated Endocytosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2017;4.
91. Popova NV, Deyev IE, Petrenko AG. Clathrin-Mediated Endocytosis and Adaptor Proteins. *Acta naturae*. 2013;6(18).



92. Boulant S, Kural C, Zeeh J-C, Ubelmann F, Kirchhausen T. Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *NATURE CELL BIOLOGY*. 2011;13(9).
93. Merrifield CJ, Kaksonen M. *Endocytic Accessory Factors and Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis*. Cold Spring Harbor. 2014;6.
94. McDermott H, Kim K. Molecular dynamics at the endocytic portal and regulations of endocytic and recycling traffics. *European Journal of Cell Biology*. 2015;94:235-48.
95. Goh LK, Sorkin A. *Endocytosis of Receptor Tyrosine Kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013.
96. Edeling MA, Smith C, Owen D. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nature review | MOLECULAR CELL BIOLOGY*. 2006;7:32-43.
97. Stang E, Blystad FD, Kazazic M, Bertelsen V, Brodahl T, Raiborg C, et al. Cbl-dependent Ubiquitination Is Required for Progression of EGF Receptors into Clathrin-coated Pits. *Molecular Biology of the Cell*. 2004;15:3591–604.
98. Stang E, Johannessen LE, Knardal SL, Madshus IH. Polyubiquitination of the Epidermal Growth Factor Receptor Occurs at the Plasma Membrane upon Ligand-induced Activation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2000;275(5):3940–13947.
99. Dietz AB, Bulur PA, Emery RL, Winters JL, Epps DE, Zubair AC, et al. A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *TRANSFUSION*. 2006;46:2083-9.
100. Néron S, Thibault L, Dussault N, Côté G, Ducas É, Pineault N, et al. Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells. *TRANSFUSION*. 2007;47:1042-9.
101. Munoz NM, Leff AR. Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection. *Nature protocol*. 2007.
102. PALACIOS R. Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *The Journal of Immunology*. 1982;128.
103. Pang B, Shin DH, Park KS, Huh YJ, Woo J, Zhang Y-H, et al. Differential pathways for calcium influx activated by concanavalin A and CD3 stimulation in Jurkat T cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2011;463:309-18.
104. Cefai D, Schneider H, Matangkasombut O, Kang H, Brody J, Rudd CE. CD28 Receptor Endocytosis Is Targeted by Mutations That Disrupt Phosphatidylinositol 3-Kinase Binding and Costimulation. *The Journal of Immunology*. 1998.
105. Walter RB, Raden BW, Zeng R, Hausermann P, Bernstein ID, Cooper JA. ITIM-dependent endocytosis of CD33-related Siglecs: role of intracellular domain, tyrosine phosphorylation, and the tyrosine phosphatases, Shp1 and Shp2. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;83.

106. Qureshi OS, Kaur S, Hou TZ, Jeffery LE, Poulter NS, Briggs Z, et al. Constitutive Clathrin-mediated Endocytosis of CTLA-4 Persists during T Cell Activation. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2012;287.
107. Assessment report OPDIVO International non-proprietary name: nivolumab. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) European Medicines Agency. 2015.
108. Assessment report Keytruda International non-proprietary name: pembrolizumab. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) European Medicines Agency. 2015.
109. Brodya R, Zhanga Y, Ballasa M, Siddiquib MK, Palvi Guptab, Barkerc C, et al. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer*. 2017;112:200-15.
110. Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015;16.
111. Choi E, Kikuchi S, Gao H, Brodzik K, Nassour I, Yopp A, et al. Mitotic regulators and the SHP2-MAPK pathway promote IR endocytosis and feedback regulation of insulin signaling. *Nature Communications*. 2019.
112. Bradshaw JD, Pin Lu GL, Rodgers J, Schieven GL, Kelly L, Bennett, Linsley PS, et al. Interaction of the Cytoplasmic Tail of CTLA-4 (CD152) with a Clathrin-Associated Protein Is Negatively Regulated by Tyrosine Phosphorylation. *Biochemistry*. 1997;36:15975-82.
113. Chuang E, Lee K-M, Robbins MD, Duerr JM, Alegre M-L, Hambor JE, et al. Regulation of Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Molecule-4 by Src Kinases. *The Journal of Immunology*. 1999.
114. Haugsten EM, Małeckci J, Bjørklund SMS, Olsnes S, Wesche J. Ubiquitination of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Is Required for Its Intracellular Sorting but Not for Its Endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*. 2008;19:3390–403.
115. Meng X, Liu X, Guo X, Jiang S, Chen T, Hu Z, et al. FBXO38 mediates PD-1 ubiquitination and regulates anti-tumour immunity of T cells. *Nature* 2018;564.
116. Peer S, Baier G, Gruber T. Cblb-deficient T cells are less susceptible to PD-L1-mediated inhibition. *Oncotarget*. 2017;8:41841-53.