

Université de Montréal

**Étude du rôle du TGF- β dans la différenciation mémoire
des lymphocytes T et son implication potentielle pour
l'immunothérapie adoptive**

Par Amina Dahmani

Département microbiologie, infectiologie et immunologie Faculté de Médecine

Université de Montréal

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de PhD en infectiologie, microbiologie et
immunologie à la Faculté des Études Supérieures

Mai, 2019

© Amina Dahmani, 2019

Résumé

Au cours des trois dernières décennies, nous avons assisté à l'émergence d'une nouvelle arme dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux, l'immunothérapie adoptive (IA). Cette thérapie a connu un succès fulgurant dans le traitement des cancers hématologiques et des mélanomes résistants aux traitements conventionnels, toutefois, son efficacité reste limitée à un nombre réduit de patients. L'efficacité de l'IA repose principalement sur la capacité des LT transférés à migrer vers le site de la tumeur et à l'infiltrer, puis à reconnaître spécifiquement les antigènes exprimés par la tumeur afin de pouvoir l'éliminer. Ces LT doivent également être capables de contourner le microenvironnement immunosuppresseur établi par la tumeur pour échapper à la surveillance immunitaire ainsi que de proliférer et de persister à long terme chez le patient afin d'assurer une protection durable contre une rechute éventuelle. Autant de paramètres que les scientifiques tentent d'améliorer dans le but d'optimiser l'efficacité de cette thérapie afin qu'un plus grand nombre de patients puisse en bénéficier. C'est dans cette optique que s'est inscrit le travail de cette thèse. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à deux paramètres en particulier; (i) la capacité des LT à persister *in-vivo*, reliée au stade de différenciation des LT au moment du transfert adoptif (TA) et (ii) leur capacité à migrer et à infiltrer la tumeur.

Plusieurs études indiquent que dans le contexte de l'IA, la différenciation des cellules T est inversement corrélée à leur efficacité anti-tumorale. En effet, le processus de différenciation des cellules T entraîne une perte de leur capacité proliférative, d'auto-renouvellement ainsi que leur multipotence, ce qui réduit leur persistance et leur capacité à induire une protection à long terme *in-vivo*. Ainsi, le transfert adoptif de LT peu différenciés, tels que les Tscm (*Stem cell like memory T cells*) ou les Tcm (*Central memory T cells*), améliore l'efficacité thérapeutique de l'IA. Dans le premier volet de cette thèse, nous avons tenté de générer des LT mémoire humains *ex-vivo* afin d'améliorer l'efficacité de l'IA, en utilisant la cytokine TGF- β (*Transforming growth factor beta*). En effet, dans la biologie du LT, le TGF- β est surtout connu pour ses effets immunorégulateurs. Cependant, aujourd'hui l'on sait que le TGF- β est bien plus qu'un immunosuppresseur et qu'il exerce ses effets pléiotropiques de façon contexte-dépendant. Notamment, des études récentes ont montré que le TGF- β était nécessaire à la formation et au maintien des LT mémoires. En accord avec ces données, nous avons démontré que l'exposition des LT humains au TGF- β durant leur phase d'activation *ex-vivo* favorisait une différenciation mémoire des LT, associée à une expression phénotypique et transcriptionnelle similaire à celle observée dans les LT centrale mémoire. Fait intéressant, le TGF- β inhibe l'expression du facteur de transcription BLIMP1, un régulateur clé de la différenciation et de la fonction des LT effecteurs, et augmente celle d'ID3, un facteur important dans la génération et le maintien des LT mémoires. De plus, l'exposition des LT au TGF- β n'a pas altéré leur prolifération, ni leur polyfonctionnalité et n'a pas entraîné la génération de lymphocytes T régulateurs (Treg). D'autre part, le transfert adoptif de LT exposés au TGF- β dans des souris immunodéficientes a induit une plus forte réactivité *in-vivo* qui s'est traduite par l'apparition plus rapide d'une GVHD (*Graft versus host disease*) et une meilleure persistance *in-vivo*. Enfin, le transfert adoptif de LT génétiquement modifiés pour exprimer un CAR (*Chimeric antigen receptor*) exposés au TGF- β dans des souris immunodéficientes a révélé une meilleure toxicité et a induit une réponse anti-tumorale plus

efficace. Notre étude a permis de révéler un nouveau rôle du TGF- β dans la différenciation mémoire des LT humains et a démontré que la signalisation du TGF- β pouvait efficacement être ciblée pour générer des Tcm *ex-vivo* dans le contexte de l'IA.

Le TGF- β a également été associé à la formation et au maintien d'une population de LT récemment identifiée et qui a pour spécificité de résider de façon permanente dans les tissus non-lymphoïdes. Ces LT résidants dans les tissus (Trm) jouent un rôle crucial dans la protection des tissus épithéliaux contre les maladies infectieuses et inflammatoires, mais aussi dans le contrôle de la réponse anti-tumorale. Leur présence dans les tumeurs est associée à un bon pronostic vital et à une meilleure réponse aux immunothérapies. De ce fait, le transfert adoptif de LT ayant des propriétés de Trm, pouvant infiltrer et être retenus plus efficacement dans les tumeurs, pourrait améliorer l'efficacité de l'IA. Dans le deuxième volet de cette thèse, nous avons tenté de déterminer si une brève exposition *ex-vivo* des LT au TGF- β permettait l'acquisition de caractéristiques favorisant la migration et la rétention des LT transférés au site de la tumeur, dans un modèle murin antigène spécifique (OT-I-OVA). Les résultats obtenus ont montré que le traitement de LT-OT-I avec du TGF- β exogène durant la phase d'activation *ex-vivo* de ces cellules, favorisait l'expression d'un phénotype de migration et de rétention tissulaire se traduisant, notamment par une plus forte expression de l'intégrine CD103 et du récepteur de chémokines CXCR3. D'un point de vue fonctionnel, les LT-OT-I traités au TGF- β avaient une meilleure capacité à migrer *in-vitro* en réponse aux ligands recombinants du CXCR3 et aux surnageants de tumeurs épithéliales LLC-OVA (*Lewis lung carcinoma* exprimant le peptide OVA) et ce, de façon dépendante des récepteurs associées aux protéines *Gia*, en général, et plus spécifiquement au CXCR3. *In vivo*, les LT-OT-I traités au TGF- β avaient également une meilleure capacité à migrer et à infiltrer les tumeurs LLC-OVA. Cependant, le transfert adoptif de ces cellules à des souris porteuses d'une tumeur LLC-OVA n'a montré qu'un modeste ralentissement de la progression tumorale à des temps précoces, et qui s'est estompé peu à peu dans le temps. Ces résultats étaient corrélés à une plus importante infiltration tumorale et au maintien de l'expression du CD103 *in-vivo*. Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique de notre stratégie, il serait intéressant d'envisager une thérapie de combinaison associant le transfert adoptif de LT-OT-I traités au TGF- β avec des inhibiteurs de points de contrôles, par exemple. L'effet synergique de ces deux thérapies permettrait d'améliorer à la fois le recrutement, la rétention ainsi que la cytotoxicité des LT transférés.

Nos résultats ont permis de révéler que l'utilisation du TGF- β durant la phase d'activation des LT *ex-vivo* permet d'induire un phénotype mémoire ainsi qu'un potentiel migratoire et de rétention intra-tumorale pouvant améliorer l'efficacité de l'IA. Le TGF- β pourrait donc être utilisé en clinique afin de générer des LT de meilleure qualité pour l'IA.

Mots-clés : TGF- β , Différenciation mémoire des LT, Immunothérapie adoptive

Abstract

Over the last three decades, adoptive immunotherapy (IA) has emerged as a curative therapy for advanced hematologic malignancies and melanoma. However, its effectiveness remains limited to only a small number of patients. The efficacy of AI mainly relies on the ability of the transferred T cells to efficiently traffic and infiltrate the tumor, and to specifically recognize tumor antigens. The transferred T cells should also be able to overcome the immunosuppressive microenvironment established by the tumor to evade immune surveillance and to proliferate and persist long-term in the patient to provide protection against eventual relapse. Many efforts have been done to improve these T-cell properties in order to optimize the effectiveness of this therapy so it can benefit to a larger number of patient. In this line, Our work focuses on the improvement of two parameters in particular; (i) the ability of T lymphocytes (LTs) to engraft and persist long-term *in-vivo*, which is related to their differentiation state at the time of adoptive transfer (AT) and (ii) their ability to traffic and infiltrate the tumor.

In the context of AI, several evidences indicate that T cell differentiation is inversely correlated with their anti-tumor efficacy. Indeed, the process of T cell differentiation results in a loss of their proliferative capacity, self-renewal ability and their multipotency, which reduces their persistence and their ability to induce long-term protection against a possible relapse. Thus, adoptive transfer of poorly differentiated LT, such as Stem cell memory T cells (Tscm) or Central Memory T cells (Tcm) improves the therapeutic efficacy of AI. In the first part of this thesis we have attempted to generate human memory LT *ex-vivo* to improve the efficiency of AI, using the TGF- β cytokine (Transforming growth factor beta). In T cell biology, TGF- β is mostly known for its immunosuppressive properties. However, we now know that TGF- β is much more than an immunosuppressive cytokine and that it exerts its pleiotropic effects in a context-dependent manner. In particular, recent studies have shown that TGF- β is necessary for the formation and maintenance of memory T cells. In concurrence with this, we demonstrated that exposure of human LTs to TGF- β during their *ex-vivo* activation phase promoted memory T cell differentiation, associated with phenotypic and transcriptional expression similar to that observed in central memory T cells. Interestingly, TGF- β inhibits the expression of the transcription factor BLIMP1, a master regulator of effector T cell differentiation and function, and inversely increases ID3 expression, a key factor in the generation and maintenance of memory T cells. Moreover, the exposure of LTs to TGF- β did not alter their proliferation or polyfunctionality and did not lead to the generation of regulatory T cells (Treg). On the other hand, adoptive transfer of LT exposed to TGF- β in immunodeficient mice induces a greater *in-vivo* reactivity which resulted in the faster onset of GVHD (Graft versus host disease) and improved persistence *in-vivo*. Finally, adoptive transfer of genetically engineered LT to express a chimeric antigen receptor (CAR) exposed to TGF- β in immunodeficient mice revealed improved toxicity and induced a more effective anti-tumor response. Our study revealed a new role for TGF- β in human T cell memory differentiation and demonstrated that TGF- β signaling could be targeted to generate Tcm *ex-vivo* in the context of AI.

TGF- β has also been associated with the formation and maintenance of a newly identified LT population that is permanently resident in non-lymphoid tissues. These tissue-resident T cells (Trm) play a crucial role in protecting epithelial tissues against infectious and inflammatory diseases, as well as in controlling the anti-tumor response. Their presence into the tumors is associated with a good prognosis and a better response to immunotherapies. As a result, adoptive transfer of LT with Trm properties, which can infiltrate and be retained more effectively into the tumors, could improve the efficacy of AI. In the second part of this thesis we sought to determine whether a brief TGF- β exposure during *ex-vivo* T cell activation for AI may confer a tumor infiltration/retention phenotype to effector T cell within tumors *in-vivo* and hence improve AI efficacy. Using OT-I TcR transgenic model, we found that exogenous TGF- β favors the expression of the integrin CD103 and the chemokine receptor CXCR3 in *ex-vivo* stimulated OT-I-T cells in the presence of the cognate antigen. We also found that TGF- β -treated T cells exhibited strong migration to recombinant CXCL9, CXCL10 and CXCL11, the three CXCR3 ligands and to LLC-OVA (Lewis lung carcinoma expressing OVA peptide) supernatants. This migration was dependant on G α proteins associated receptors in general, and more specifically on CXCR3. Furthermore, using *in vivo* competitive homing assays, we found that TGF- β improves T-cell trafficking in LLC-OVA tumors. Finally, adoptive transfer of TGF- β -treated T cells into LLC-OVA-bearing mice slightly but significantly delayed tumor growth at early time points, which correlated with higher intratumoral T cell infiltration and maintenance of CD103 expression *in vivo*. In order to improve the therapeutic efficacy of our strategy, it would be interesting to envisage a combination therapy associating the adoptive transfer of LT-OT-I treated with TGF- β with check-point inhibitors. The synergistic effect of these two therapies may enhance both T cell localization within tumor and cytotoxicity thereby enhancing the anti-tumor response and improving the therapeutic effectiveness of AI.

Our results have revealed that the use of TGF- β during the *ex-vivo* activation phase of LT promotes the induction a memory phenotype as well as a migratory and intra-tumor retention potential that can improve the efficacy of AI. We have provide the rational for clinical use of TGF- β for the generation of improved T cells for AI.

Keywords: TGF- β , T cell memory differentiation, Adoptive immunotherapy

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	iii
Introduction.....	1
1. Immunologie des tumeurs et immunothérapies.....	2
1.1 Généralités sur le cancer.....	2
1.2 Le concept d'immunosurveillance.....	4
1.3 Le concept d'immunoédition du cancer.....	7
1.3.1 La phase de reconnaissance et d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire.....	7
1.3.2 La phase d'équilibre.....	9

1.3.3 La phase d'échappement au système immunitaire.....	12
1.3.3.1 Perte de la reconnaissance de la tumeur par les cellules du système immunitaire.....	12
1.3.3.2 Résistance aux signaux de mort cellulaire	13
1.3.3.3 Production de molécules immunosuppressives	14
1.3.3.4 Les cellules régulatrices	16
1.3.3.5 Induction de l'anergie et de l'épuisement des cellules T activées	18
1.4 L'immunothérapie du cancer.....	22
1.4.1 La vaccination.....	23
1.4.2 L'inhibition des points de contrôle immunitaire	26
1.4.3 Le virothérapie oncolytique	28
1.4.4 L'immunothérapie adoptive (IA)	30
1.4.4.1 Les TILs	32
1.4.4.2 Les TCR transgéniques (TCR-Tg).....	33
1.4.4.3 Les récepteurs antigéniques chimériques (CARs)	35
1.4.4.4 Paramètres qui déterminent le succès de l'IA	38
1.4.4.4.1 Le stade de différenciation des LT.....	39

1.4.4.4.1.1 L'hétérogénéité des LT et son importance pour l'IA.....	41
4.4.4.1.2 Moduler la différenciation des LT pour améliorer l'efficacité de l'IA	49
4.4.4. 2 La migration et la rétention des LT transférés vers le site de la tumeur	55
4.4.4. 2.1 Evénements clés du processus de migration des LT.....	56
4.4.4. 2.2 Améliorer la migration des LT dans le contexte de l'IA.....	57
2. Le rôle du TGF- β dans la biologie du LT et son implication en immunothérapie	61
2.1 Expression, activation et signalisation du TGF- β	62
2.2 Rôle du TGF- β dans la régulation du système immunitaire	64
2.3 Rôle du TGF- β dans le cancer et son implication en IA.....	71
Hypothèse et objectifs.....	76
Résultats.....	78
Article 1: TGF- β programs central-memory differentiation in ex vivo stimulated human T cells.....	79
Introduction.....	83
Matériaux et Méthodes.....	85
Résultats.....	91

1. Exposure to exogenous TGF- β during T-cell activation leads to Tcm accumulation.....	91
2. TGF- β confers an early memory gene expression signature to ex vivo stimulated T cells	93
3. The effects of TGF- β on T-cell phenotypes are independent of T-cell expansion and are associated with improved polyfunctional cytokine secretion	94
4. Brief TGF- β exposure during T-cell activation does not induce regulatory T-cell differentiation.	96
5. TGF- β exposure confers an enhanced capacity to expand, persist and mediate alloreactivity after adoptive transfer in immunodeficient mice	97
6. TGF- β imparts Tcm features to genetically modified T cells <i>in vitro</i> leading to improved CAR T-cell therapy <i>in vivo</i>	98
Discussion.....	100
Remerciements.....	104
Références.....	105
Légendes de Figures	109
2. Evaluer le potentiel du TGF- β à améliorer la migration et la rétention des LT-OT-I stimulés <i>ex-vivo</i> vers le site de la tumeur, dans un modèle murin de carcinome pulmonaire exprimant le peptide OVA (Lewis Lung Carcinoma-LLC-OVA).....	128

2.1 Mise en contexte	128
2.2 Matériel et méthodes.....	129
2.3 Résultats.....	133
2.3.1 Le TGF- β induit l'expression du CD103 et du CXCR3 <i>ex-vivo</i>	133
2.3.2 Les cellules T traitées au TGF- β ont une meilleure capacité à migrer <i>in vitro</i> en réponse aux ligands du CXCR3 et aux surnageants de LLC-OVA	136
2.3.3 TGF- β aide à améliorer l'infiltration des LT-OT-I dans les tumeurs LLC- OVA.....	138
2.3.4 Les LT traités au TGF- β ralentissent de façon modeste mais significative le développement de la tumeur	141
2.3.5 TGF- β induit l'expression du CD103 dans les LT humains stimulés <i>ex vivo</i> ainsi qu'un programme transcriptionnel associé aux Trm	143
Discussion.....	147
1. Le TGF- β dans la différenciation mémoire des lymphocytes T humains.....	147
1.1 TGF- β induit l'expression de marqueurs associés à la différenciation mémoire des LT.....	148
1.2 TGF- β imprime une signature génétique mémoire sur les LT humains	151

1.3 L'effet du TGF- β est indépendant de la prolifération et améliore la polyfonctionnalité des LT humains	160
1.4 TGF- β n'induit pas la génération de Treg ni de Th17	162
1.5 TGF- β améliore la prolifération, la persistance et la réactivité des LT humains <i>in vivo</i> dans un modèle de GVHD et un modèle tumoral	163
1.6 Cibler TGF- β en immunothérapie.....	165
1.7 TGF- β induit l'expression du CD103 et favorise l'expression de gènes associés au Trm chez l'humain	169
2. TGF- β favorise la migration et la rétention intra-tumorale des LT	170
Conclusion	179
Bibliographie.....	181
Annexe1: TGF- β in T cell biology: implications for	ii
cancer immunotherapy.....	ii
Introduction	3
TGF-β: suppressor of T-cell proliferation and effector functions	ii
TGF-β: master regulator of T-cell homeostasis and differentiation	iv

TGF- β : architect of the immune tumor microenvironment and therapeutic opportunities..... vii

Conclusions and perspectives x

Liste des figures

Figure 1: Les différentes caractéristiques d'une cellule cancéreuse (adapté de(4, 5)).....	4
Figure 2: Le concept d'immunoédition du cancer (adapté de (18))	6
Figure 3: La phase de reconnaissance ou d'élimination du cancer (adaptée de (16)).....	9
Figure 4: La phase d'équilibre (adaptée de (16))	11
Figure 5: Les différents mécanismes de la phase d'échappement tumorale (adaptée de (16))	20
Figure 6: Schéma représentant les différents composants du TCR endogène, d'un TCR et d'un CAR génétiquement modifiés (adaptée de (205)).....	38
Figure 7: Différents modèles pouvant expliquer la génération des LT mémoire et effecteur (adapté de (206)).....	41
Figure 8: Modèle de différenciation progressive des lymphocytes T (adapté de (207))	48
Figure 9: Caractéristiques générales des lymphocytes CD8 ⁺ résidants mémoires (adaptée de (244)).....	49
Figure 10: Différentes approches permettant d'obtenir des LT CD8 ⁺ spécifiques de la tumeur minimalement différenciés (adaptée de (273)).....	55
Figure 11: Représentation schématique des voies de signalisation canoniques et non- canoniques du TGF- β (adaptée de (353))	64

Figure 12: Régulation des cellules du système immunitaire par le TGF- β (adaptée de (339)).....	71
Figure 13: Effets du TGF- β sur la réponse immunitaire dans le microenvironnement tumoral (adaptée de (339)).....	75
Figure 14: Le TGF- β induit l'expression du CD103 et du CXCR3 <i>ex-vivo</i>	135
Figure 15: Les cellules T traitées au TGF- β ont une meilleure capacité à migrer <i>in-vitro</i> en réponse aux ligands du CXCR3 et aux surnageants de LLC-OVA	137
Figure 16: TGF- β aide à améliorer l'infiltration des LT-OT-I dans les tumeurs LLC-OVA	140
Figure 17: Les LT traités au TGF- β ralentissent de façon modeste mais significative à des temps précoces le développement de la tumeur.....	142
Figure 18: TGF- β induit l'expression de CD103 dans les LT humains stimulés <i>ex-vivo</i> ainsi qu'un programme transcriptionnel associé aux Trm	146

Liste des tableaux

Tableau I. Le tableau répertorie les inhibiteurs les plus connus des fonctions des cellules T dans le microenvironnement tumoral. La liste n'est pas exhaustive car d'autres facteurs de blocage peuvent être présents. Chaque tumeur développe sa propre signature immunosuppressive et le degré de dysfonctionnement des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral varie largement d'une tumeur à l'autre en fonction de la signature prédominante. Abréviations: PGE2, Prostaglandine E2; TA, antigène tumoral; TCR, récepteur des lymphocytes T (adapté de). 20

Liste des abréviations

ADAM: metallopeptidase domain	CFSE: Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
ADN: Acide desoxyribonucleique	CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
AhR: Aryl Hydrocarbon Receptor	CRISPRcas: CRISPR- clustered regularly interspaced palindromic repeat
AICD: Activation-Induced Cell Death	CSF-1: Colony stimulating factor
AIRC: Agence Internationale de la Recherche contre le Cancer	CSH : Cellules souches hématopoïétiques
ALK5: Activin Receptor-Like Kinase 5	CTL: Lymphocytes T cytotoxiques
AMPK: AMP-activated protein kinase	CTLA-4 : antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques
APC: Cellules présentatrices d'antigènes	CTV: CellTrace™ Violet
ARG1: Arginase-1	CTY: Cell Trace Yellow
miARN: micros ARN	DAMPs : Danger-associated molecular patterns
ARN: Acide ribonucleique	DC : Cellules dendritiques
AT: Antigènes tumoraux	DGK-ζ: Diacylglycerol kinases
AV: annexinV	DNMT3A: ADN méthyltransférase 3A
BCL-2: B-cell lymphoma 2	EBNA1: Epstein–Barr nuclear antigen 1
BCMA: B- Cell Maturation Antigen	EBV: virus Epstein-Barr
BLIMP1: B lymphocyte-induced maturation protein-1	EMT: Transition épithélio-mésenchymateuse
BMP: morphogenetic protein	EOME: Eomesodermin
BTLA: B- and T-lymphocyte attenuator	EZH2: Enhancer of zeste homolog 2)
CAR: Chimeric antigen receptor	FASLG: FAS ligand
CCR: récepteur de chimiokine CC	FDA: Food and Drug Administration
CE: Cellules endothéliales	
CFLIP: Cellular FLICE-inhibitory protein	

FGFs: Fibroblast Growth Factors	iNK : Invariant natural killer T cells-
GAL-9: Galectin-9	iNOS: NO synthase inducible
GITR: Glucocorticoid-induced TNFR-related protein	iPSC: Induced Pluripotent Stem cells
GMO : Greffe de moelle osseuse	KLF: Kruppel-like factor
GSK3 β : Glycogensynthase 3 β	KLRG1: Killer Cell Lectinlike Receptor subfamily G, member 1
GVHD: Graft Versus Host Disease	LAG-3: Lymphocyte-activation gene 3
GvL : Graft versus Leukemia	LAP: Latency-associated protein
GZM : Granzymes	LB: Lymphocytes B
HLA : Human leucocyte antigen	LCMV: lymphocytic choriomeningitis virus
HPV: Papillomavirus humain	LEF1: lymphoid enhancer-binding factor 1
IA: Immunothérapie adoptive	LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen 1
ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule	LLC-OVA : Lewis lung carcinoma exprimant le peptide OVA
iCasp9: Caspase 9 inducible	LPS : Lipopolysaccharide
ID: Inhibitor of DNA-binding/differentiation proteins	LT : Lymphocytes T
IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase	LTBP: Latent-TGF- β -binding protein
IEL: Intra-epithelial lymphocytes	LT $\gamma\delta$: Lymphocytes T $\gamma\delta$
IFN: Interféron- γ	MAPKs: Mitogen-activating protein kinases
Iga: Immunoglobuline A	MART-1: Melanoma-associated antigen recognized by T cells
IKK: Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase	MDSC: Myeloid-derived suppressor cells
IL-: Interleukine	mTOR: Mammalian target of rapamycin
ILC: Innate lymphoid cell	NADPH : Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (réduite)
ILT3 et 4: Ig-like transcript-3 and -4	
ILTC: Innate-like T cells	

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

NF- κ B: Nuclear factor-kappa B

NK: Natural killer

NKG2D: Natural killer group 2, member D

NKT: Natural Killer T cells

NO: Oxydes nitriques

NSG: NOD/SCID/IL2R γ null

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

PD-1: Programmed cell death

PDL1: Programmed cell death ligand1

PGE2: Prostaglandine E2e

PI: Propidium iodide

PI3K δ : Phosphatidylinositol 3-kinase δ

PTK: Protein tyrosine kinases

PTX: Toxine pertussique

REP: Rapid Expansion Procedure

ROS: Dérivés réactifs de l'oxygène

S1PR1: sphingosine-1-phosphate receptor 1

SBE: Smad Binding Elements
SEM: standard error of the mean

SI: Système immunitaire

siRNA: Small interfering RNA

TA: Transfert adoptif

TAM: Macrophages infiltrant la tumeur

TAN: Neutrophiles infiltrant la tumeur

TAP: Transporter Associated with Antigen Processing

TCF: T cell factor 7

Tcm: Central memory T cells

TCR: T cell receptor

TCR-Tg: Transgenic T cell receptor

Teff: Effector T cells

Tem: Effector memory T cells

TGFbR: Transforming growth factor beta receptor

TGF- β : Transforming growth factor beta

TIF1: Transcriptional intermediary factor 1 gamma

TILs- : Tumor Infiltrating Lymphocytes)

Tim- 3: T cell Immunoglobulin Mucin Protein-3

TLR: Toll like receptors

TNF- α : Tumour Necrosis Factor- α

TRAIL: Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

Treg: Lymphocytes T régulateurs

Trm: Resident memory T cells

Tscm: Stem cell like memory T cells

TSDR: (C) Regulatory T cell-specific demethylation region

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF: Vascular Endothelial Growth
Factor

VHB: Virus de l'hépatite B

VIP: Vasoactive intestinal peptide

VISTA: V-domain Ig suppressor of T cell
activation

VLA-4: Very late antigen 4

VPH: Virus du Papillome humain

ZEB: zinc finger E-box binding homeobox

"C'est une triste chose de songer que la nature parle et que le genre humain ne l'écoute pas" Victor Hugo (1802-1885)

Remerciements

Il m'est agréable, au terme de ce travail, de remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, participé à l'accomplissement de mon projet.

C'est avec beaucoup d'émotions et de sincérité que je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Jean-Sébastien Delisle, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur des projets stimulants et innovants dans un environnement sain et bienveillant. Plus qu'un directeur de recherche, tu as été pour moi un mentor tant sur le plan professionnel que sur le plan humain. Je ne te remercierai jamais assez pour ta disponibilité, ton écoute, ton soutien, ton ouverture d'esprit, ta confiance, ta bienveillance et surtout pour ta patience que j'ai à plusieurs reprises mise à rude épreuve. Tant de qualités qui m'ont permis d'évoluer et de m'épanouir pour devenir la scientifique accomplie que je suis aujourd'hui, et qui m'inspireront pour toujours un profond respect et une grande admiration.

Je n'aurais jamais pu atteindre mes objectifs sans l'aide précieuse et le soutien de mes collègues, Cédric, Valérie et Manon, qui ont consacré des heures de leurs journées, de leurs soirées et parfois de leurs week-ends à travailler forts, et parfois dans la précipitation, pour le bon avancement de mes projets. Je vous remercie infiniment pour toute l'aide que vous m'avez apporté. Manon, avant que tu ne décides de traverser à nouveau l'atlantique avec ta petite famille, nous avons eu le temps de tisser des liens d'amitié et, sans le savoir, tu as donné un meilleur goût à ma vie. Merci d'être la merveilleuse personne que tu es.

Tout au long de ces nombreuses années passées au laboratoire, j'ai eu le privilège de rencontrer et de côtoyer de très belles personnes qui m'ont enrichi tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel. Des équipes toujours dynamiques, motivantes et collaboratives. Merci à tous mes anciens et récents collègues pour avoir rendu mes nombreuses heures passées au laboratoire plus agréables et plus stimulantes.

Merci à toutes les personnes qui ont siégé sur mes comités et qui m'ont donné de précieux conseils pour l'avancement de mes projets : Dr Sylvie Lesage, Dr Martin Guimond, Dr John Stagg et Dr Réjeant Lapointe.

Merci à tous les membres de mon jury qui ont accepté d'examiner mon travail en de très courts délais et qui ont contribué à son amélioration par leurs précieux conseils: Dr Martin Guimond, le président rapporteur; Dr Martin Richer, examinateur externe; Dr Nicolas Chomont, examinateur interne et Dr Jean-François Cailhier, représentant du doyen.

Je n'aurais pas pu arriver au bout sans le soutien et l'amour de mes amis, qui loin de mon pays, sont devenus pour moi une deuxième famille. Merci à Stéphanie, Soumia, Sami, Amira, Hanane, Martine ainsi que tous les autres pour votre écoute, votre soutien, les soirées, les BBQ, les campings, et j'en passe. Vous avez fait partie de cette aventure et avez partagé avec moi les bons et les moins bons moments. Puisse notre amitié durer pour toujours.

Merci à mon grand frère, Mahdi, qui est toujours venue à ma rescousse et qui a su m'épauler à chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci à ma belle-sœur et à mes adorables nièces qui m'ont apporté l'équilibre, la douceur et l'amour dont j'avais besoin pour me ressourcer.

Merci à ma grande sœur, Nawel, qui, même à 6 heures de décalage horaire, à toujours trouver le temps pour m'écouter parler des heures durant et qui a su trouver les bons mots pour me reconforter. Merci à mes chers neveux pour leur amour.

Enfin, à mes chers et précieux parents sans qui rien n'aurait été possible. Je vous remercie d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenu dans mes choix et mes décisions, au dépend de votre confort émotionnel et matériel. Merci de m'avoir donné l'amour, l'éducation et le confort nécessaire à mon épanouissement. Vous m'avez aussi transmis le gout du travail bien fait en héritage et c'est grâce à ça que je suis arrivée jusqu'à là aujourd'hui. Puissiez-vous être fières de mes accomplissements.

Introduction

1. Immunologie des tumeurs et immunothérapies

1.1 Généralités sur le cancer

Le cancer est considéré aujourd'hui comme le mal du 21^{ème} siècle. Il touche un homme sur cinq et une femme sur six au cours de leur vie, et tue un homme sur huit et une femme sur onze, selon les chiffres mondiaux dévoilés par l'Agence Internationale de la Recherche contre le Cancer (AIRC). Il y aurait donc, pour l'année 2018, plus de 18.1 millions nouveaux cas de cancer dont plus de 9 millions de décès dans le monde (1). Au Canada, on considère que 206 200 Canadiens développeront un cancer et que 80 800 en mourront en 2017; le cancer du poumon étant la principale cause de décès par cancer. Bien qu'un nombre grandissant de Canadiens vivent au moins cinq années après avoir reçu un diagnostic de cancer, ce dernier demeure la principale cause de décès au Canada (2). Ces chiffres alarmants et en constante progression témoignent de l'urgence d'élaborer des stratégies plus efficaces de prévention et de lutte contre le cancer pour endiguer ce fléau.

Dans cette optique, des efforts considérables ont été réalisés durant les dernières décennies dans la compréhension des différentes étapes de la cancérogénèse et des processus complexes qui la gouvernent. Aujourd'hui on sait que la transformation d'une cellule normale en cellule maligne est un long processus multi-étapes (3). Elle est provoquée par l'accumulation consécutive d'altérations génétiques et épigénétiques qui conduisent généralement à une instabilité génomique de la cellule. Ces altérations peuvent être initiées par des facteurs génétiques héréditaires (mutations germinales) et/ou par des facteurs environnementaux (tabagisme, consommation d'alcool, un indice élevé de masse corporelle,

sédentarité, exposition à des cancérogènes chimiques, à des rayonnements, à des virus,...). Au terme de sa transformation, une cellule maligne a acquis différentes caractéristiques, définies par Hanahan et Weinberg comme suit: une autosuffisance en facteurs de croissance, une résistance aux signaux antiprolifératifs, une résistance à l'apoptose, un potentiel de réplication illimité, une angiogenèse soutenue, une reprogrammation du métabolisme énergétique, l'induction de l'inflammation ainsi qu'un potentiel métastatique et d'invasion tissulaire (4, 5). Ces modifications physiologiques subies par les cellules malignes sont souvent accompagnées d'une libération de «signaux de danger», ainsi que par l'expression de protéines ectopiques ou mutées qui les rendent visibles au système immunitaire et permettant ainsi leur élimination. Toutefois, les cellules tumorales peuvent aussi contourner la surveillance du système immunitaire par différentes stratégies, rendant ainsi leur élimination difficile (6, 7) (Fig. 1).

Dans ce chapitre nous allons résumer la relation complexe entre le système immunitaire et la tumeur, les différentes stratégies mises en place par la tumeur pour échapper à la surveillance du système immunitaire ainsi que les différentes approches d'immunothérapie développées pour rétablir la réponse anti-tumorale chez les patients cancéreux.

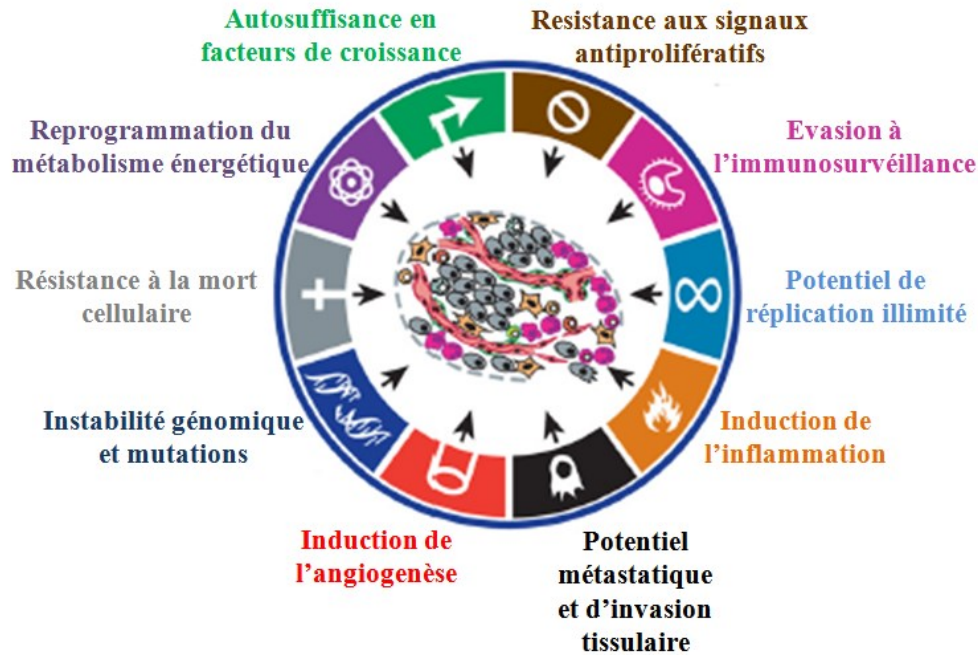


Figure 1: Les différentes caractéristiques d'une cellule cancéreuse (adapté de(4, 5))

1.2 Le concept d'immunosurveillance

On a longtemps pensé que le rôle du système immunitaire (SI) se limitait à protéger l'organisme contre les différents pathogènes exogènes (virus, bactéries, parasites,..) auxquels il est quotidiennement exposé. Cette définition reposait sur le concept que le système immunitaire a la capacité de distinguer le soi et le non- soi. Jusqu'au jour où Frank MacFarlane Burnet et Lewis Thomas émirent l'hypothèse selon laquelle le SI serait aussi capable de reconnaître et d'éliminer continuellement les cellules transformées ou anormales du soi, avant même que la tumeur ne soit cliniquement détectable (8-10). Cette hypothèse, dite "d'immunosurveillance", a été soutenue par de nombreuses observations, telles que la révélation de tumeurs cliniquement invisibles lors de nombreuses autopsies, la régression spontanée de certaines tumeurs ainsi que la prévalence des tumeurs chez les personnes âgées

ou les personnes immunodéprimées (11). Cependant, cette théorie a longtemps été contestée en raison du manque de preuves expérimentales ainsi que les observations de Stutman selon lesquelles les souris *nudes*, athymiques, ne sont pas plus susceptibles de développer des tumeurs, spontanées ou induites par un agent chimique, que des souris immunocompétentes (12). Ce n'est qu'à la fin du siècle dernier, avec notamment l'avènement de nouveaux modèles de souris mutées (mutation pour l'interféron- γ (IFN γ), la perforine et les cellules natural killer (NK)) et d'anticorps monoclonaux hautement spécifiques, que l'on a compris l'importance des différents acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative contre le développement de certaines tumeurs (13-15). Plus tard, une étude a montré, dans un modèle de sarcome induit par le méthylcholanthrene, que les souris immunodéficientes développaient des tumeurs plus immunogènes que les souris immunocompétentes (13). Ceci suggérait alors que le SI était non seulement capable d'éliminer des tumeurs fortement immunogènes, mais qu'il pouvait aussi sélectionner des clones tumoraux ayant une immunogénicité réduite (16), ce qui leur permet d'échapper à l'immunosurveillance de l'hôte.

Grâce à ces études, nous savons aujourd'hui que le concept d'immuno-surveillance ne représente que l'une des multiples facettes des interactions complexes entre le SI et la tumeur. En effet, le SI peut non seulement prévenir le cancer en détruisant les tumeurs hautement immunogènes en développement, mais il peut aussi façonner, sculpter ou modifier l'immunogénicité des cellules cancéreuses ayant résisté à la destruction par le SI (17). Ce nouveau concept dit "d'immuno-édition", émis pour la première fois en 2002 par Dunn (7), et demeurant à ce jour le modèle dominant pour décrire les relations entre le système immunitaire et le cancer, est un processus induit par l'antigénicité tumorale qui entraîne soit le rejet de la tumeur (phase d'élimination- anciennement appelée immuno-surveillance), le

contrôle de la croissance des cellules tumorales résiduelles (équilibre), ou l'échappement de la tumeur au contrôle du SI (évasion) (16). (Fig. 2)

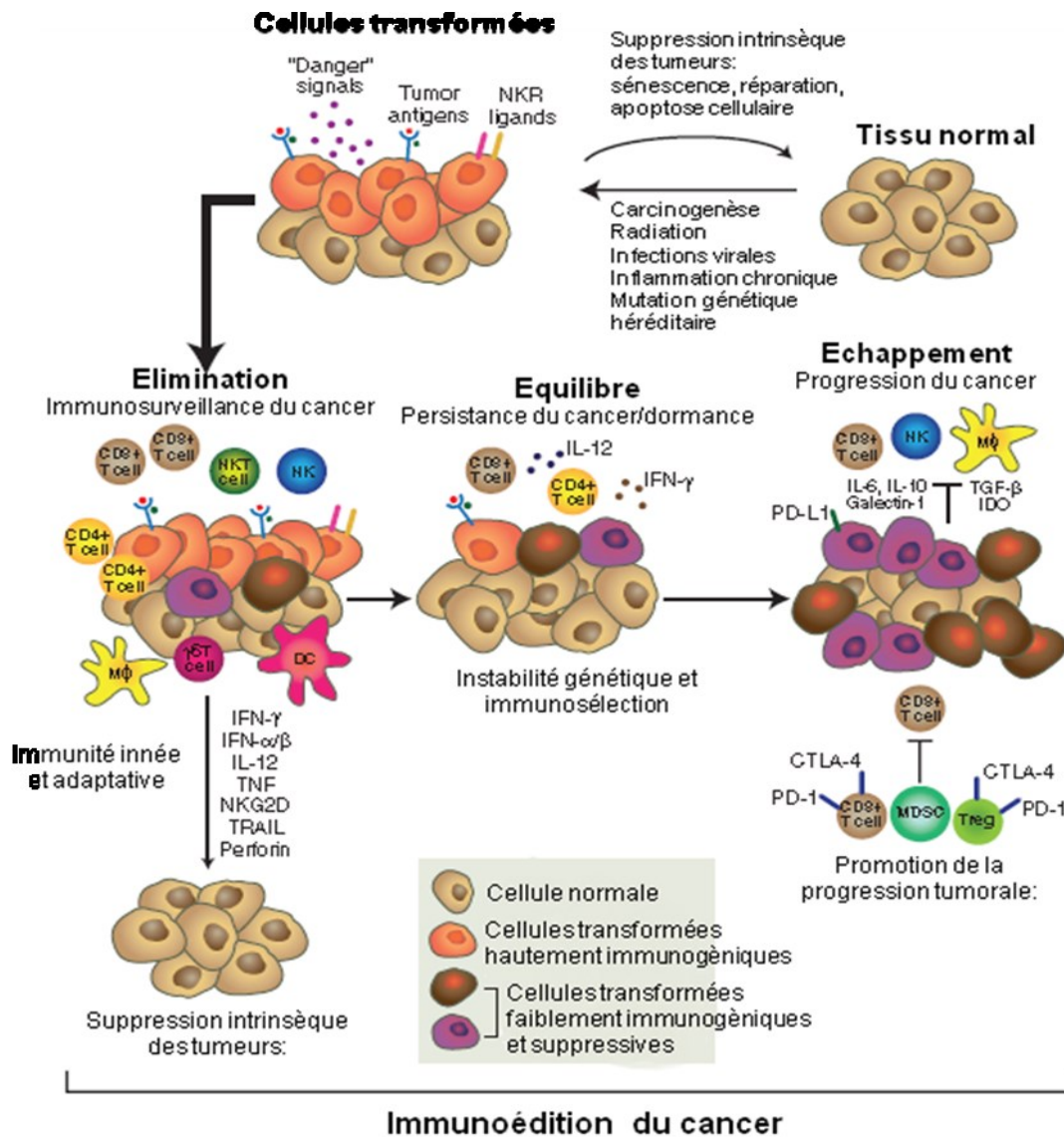


Figure 2: Le concept d'immunoédition du cancer (adapté de (18))

Ce diagramme schématique illustre les trois phases (3 E) de l'immunoédition du cancer proposées par Schreiber et ses collègues: Élimination, Équilibre et Échappement. Les cellules transformées proviennent de tissus normaux à la suite de mutations spontanées ou induites par

un cancérigène. Divers mécanismes intrinsèques de suppression des tumeurs existent pour détecter et éliminer ces cellules mutantes/anormales. Lorsque la suppression tumorale intrinsèque échoue, les trois phases de l'immunoédition du cancer commencent. Au cours de la phase d'élimination, les cellules transformées sont détectées et tuées par les agents de l'immunité innée et adaptative, appel. Dans le cas où les cellules transformées survivent à la phase d'élimination, elles peuvent toujours être maintenues dans un état de dormance à par les cellules immunitaires dans la phase d'équilibre. Les cellules transformées dormantes peuvent subir une immuno-édition, ce qui entraîne une perte d'immunogénicité. Elles entrent de ce fait dans la phase d'échappement, durant laquelle elles commencent à se développer progressivement, établissent un microenvironnement tumoral immunosuppresseur et donnent lieu à des tumeurs cliniquement apparentes.

1.3 Le concept d'immunoédition du cancer

1.3.1 La phase de reconnaissance et d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire

Cette phase se caractérise par deux types d'évènements ; (i) l'apparition d'antigènes tumoraux (suite notamment aux mutations associées au processus néoplasique) reconnus par le système adaptatif et (ii) le développement d'un milieu inflammatoire associé à l'expression de signaux capables de stimuler une réponse innée.

Les cellules de l'immunité innées, les cellules NK (*Natural Killer*-NK) et les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) peuvent reconnaître les tumeurs naissantes grâce à l'interaction de leurs récepteurs avec des ligands de NKG2D (*Natural killer group 2, member D*), ou avec des complexes glycolipides-CD1, respectivement, dont l'expression sur les tumeurs est induite soit par l'inflammation ou par le processus de transformation cellulaire lui-même. Ce mécanisme de reconnaissance précis entraîne la progression de la réponse antitumorale et la production de l'interféron- γ (IFN- γ) (19). Ce dernier, induit à son tour la production de chimiokines, telles que le CXCL-9, 10 et 11, par les cellules tumorales, mais aussi par les tissus sains environnant

qui recrutent d'avantage de cellules du SI inné vers le site de la tumeur. Les cellules NK activées produisent elles aussi de l'IFN- γ . Celui-ci peut ensuite activer un ensemble de processus antiprolifératifs (20), proapoptotiques (21) et angiostatiques (22) qui participent à l'élimination de la tumeur. La mort des cellules tumorales induite par ces différents mécanismes engendre la libération de débris cellulaires et d'antigènes tumoraux (AT) dans le microenvironnement tumoral qui vont être phagocytés et apprêtés par les cellules dendritiques (DC), qui sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (APC). Les DC activées migrent vers les ganglions lymphatiques drainants où elles activent à leur tour les effecteurs de l'immunité adaptative. Pour ce faire, les DC présentent des peptides antigéniques associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II aux lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, dits « helper » (Th), qui grâce à leur récepteur de lymphocytes T (TCR) peuvent reconnaître spécifiquement un peptide présenté par le CMH-II (23). Les LT CD4 peuvent alors acquérir soit un profil Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 ou de type LT (24) régulateurs (Treg) (23). De même, les LT CD8, dits « cytotoxiques » (CTL), vont eux aussi être activés suite à la reconnaissance par leur TCR de peptides plus courts associés au CMH de classe I, exprimés par les DC. Une fois les cellules de l'immunité adaptative activées, celles-ci migrent vers le site de la tumeur où elles peuvent exercer une action antitumorale directe *via* la sécrétion de cytokines, telles que TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*), la libération de granules cytotoxiques contenant de la perforine et du Granzyme, ou par les récepteurs de morts, tels que FAS/FASL, par contact cellulaire direct avec la cible; ou indirecte par la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α (24), par exemple, qui permettent de recruter et d'activer d'autres cellules immunitaires ainsi que par un effet anti-angiogénique.

Globalement, les travaux sur l'immuno-édition montrent l'effet dominant des LT dans ce processus, mais plusieurs études évoquent aussi le rôle d'autres cellules telles que les lymphocytes B, les DC et les cellules du système inné dans la reconnaissance et l'élimination des cancers naissants.

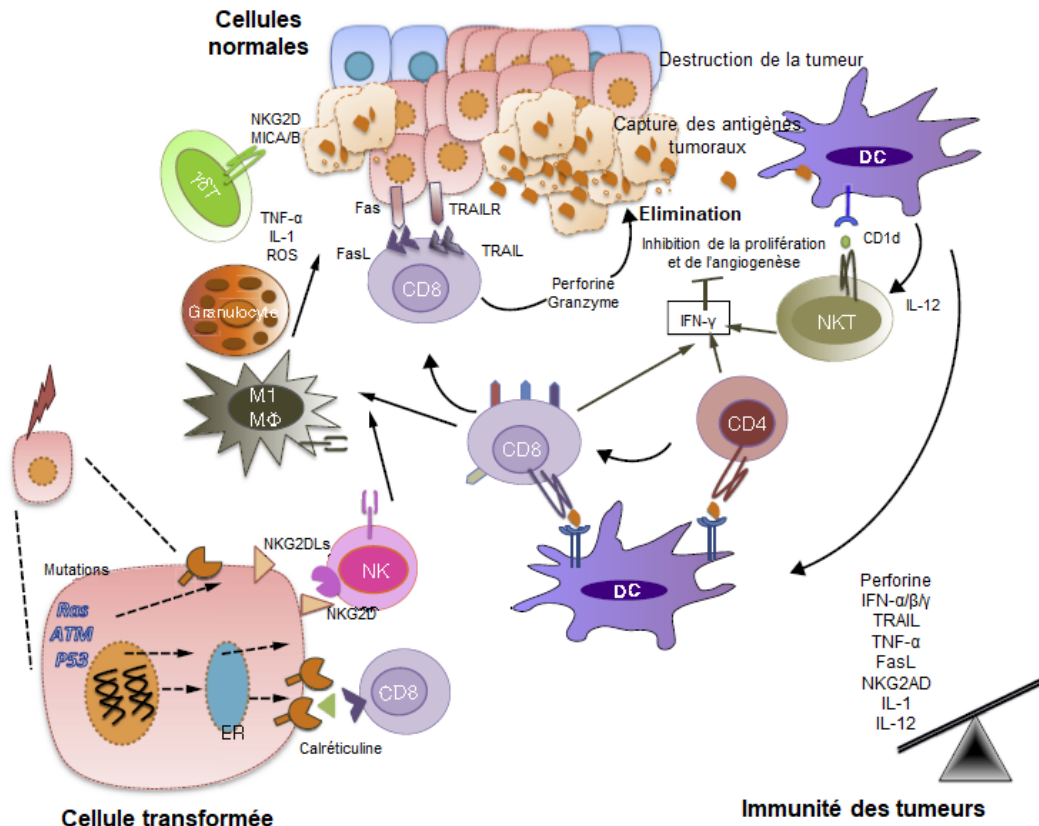


Figure 3: La phase de reconnaissance ou d'élimination du cancer (adaptée de (16))

1.3.2 La phase d'équilibre

Cette phase constitue la phase la plus longue de l'immunoédition du cancer; elle peut perdurer plusieurs années, voire toute la vie chez un humain. Durant cette phase, les cellules du SI et les variants tumoraux qui ont survécu à la phase d'élimination rentrent en équilibre;

les cellules tumorales sont alors en dormance et sont cliniquement invisibles (25). En effet, les effecteurs du SI exercent de façon continue une forte pression de sélection pour moduler et contrôler les différentes cellules génétiquement instables et mutées, contenues dans le lit de la tumeur. De cette façon, plusieurs clones tumoraux sont éliminés, mais d'autres avec de nouvelles mutations apparaissent. A la fin de cette phase, une nouvelle population de variants tumoraux moins immunogènes et plus résistants au SI subsiste.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette phase sont mal définis, notamment parce qu'elle est difficile à modéliser chez la souris et a été décrite de façon anecdotique chez l'humain d'après des observations cliniques, telle que l'apparition d'un mélanome métastatique chez deux patients ayant reçu une transplantation de rein provenant du même donneur (26). Une étude réalisée sur un modèle murin de fibrosarcome induit, a montré l'implication majeure du SI adaptatif dans le maintien des cellules tumorales en dormance, en particulier la réponse de type I (IFN- γ) (27). Ces résultats sont soutenus par deux autres études qui ont montré que des LT antigène-spécifiques peuvent inhiber la croissance d'une tumeur pancréatique induite (*Tag-multistage carcinogenesis*), par l'action combinée de l'IFN- γ et du TNF- α qui provoquent la sénescence (28) des cellules tumorales (29). De plus, une étude sur un modèle de tumeur pancréatique induite et sur des tumeurs p53 déficientes a montré les rôles opposés de l'IL-12 et de l'IL-23 dans le maintien de la tumeur en phase d'équilibre. En effet, l'IL-12 permet de réduire la croissance tumorale tandis que l'IL-23 la promeut (30). Enfin, une étude récente a comparé le microenvironnement d'une tumeur en phase d'équilibre à celui d'une tumeur qui a échappé à l'immunosurveillance de l'hôte. Les résultats obtenus ont montré que la présence d'une forte proportion de LT CD8⁺, de cellules NK et de LT $\gamma\delta$ et une faible proportion de cellules NKT (*Natural Killer T cells*), de Treg Foxp3⁺ et de MDSCs (*Myeloid-derived*

suppressor cells) était associée au maintien de la tumeur en phase d'équilibre, suggérant que la balance entre les cellules immunosuppressives et les cellules effectrices présentes dans le microenvironnement tumorale peut déterminer le devenir d'une tumeur (31).

Ainsi, durant la phase d'équilibre, les cellules tumorales sont soit maintenues en latence ou éliminées par le SI, ou alors, elles échappent à l'immunosurveillance et transitent vers la phase finale de l'immunoédition du cancer.

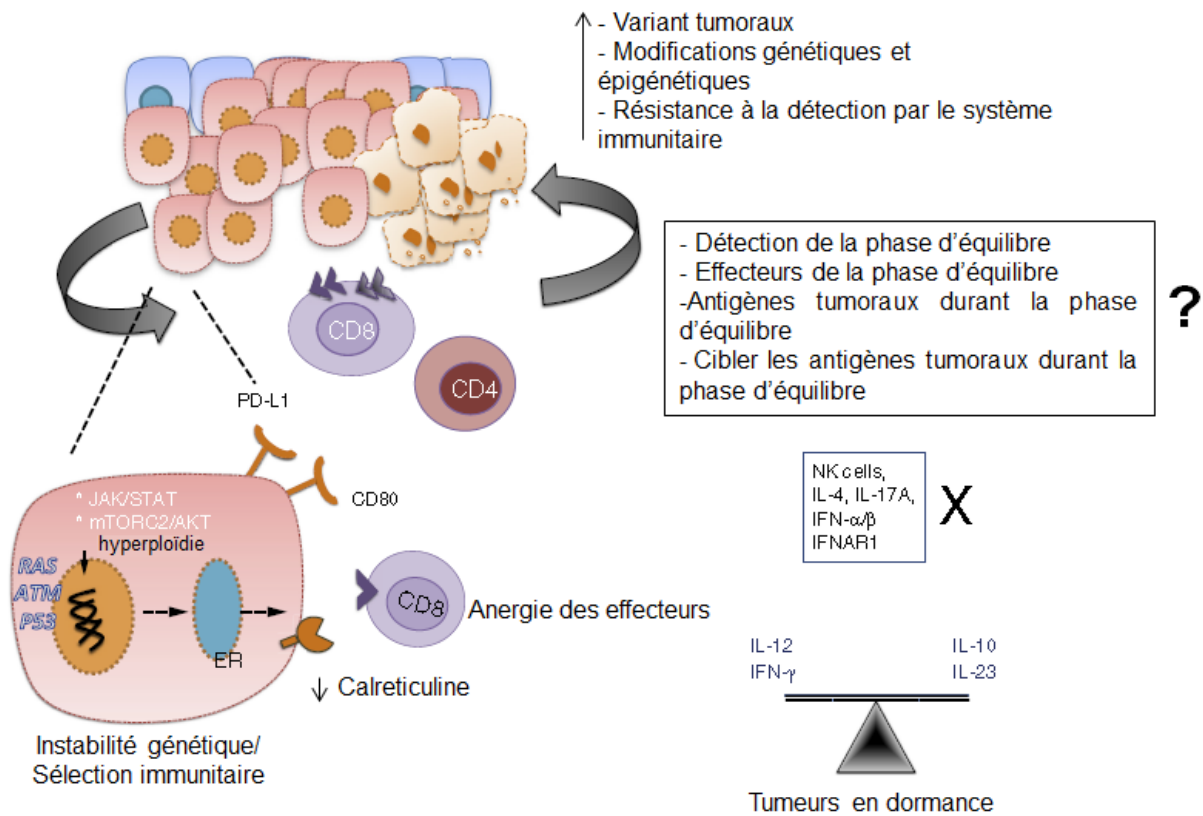


Figure 4: La phase d'équilibre (adaptée de (16))

1.3.3 La phase d'échappement au système immunitaire

Cette phase se caractérise essentiellement par la capacité des cellules malignes à élaborer des stratégies pour contourner la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, les variants tumoraux qui ont survécu à la phase d'élimination et d'équilibre subissent des modifications génétiques et épigénétiques qui leur confèrent la capacité d'échapper soit à la reconnaissance ou à l'élimination par le système immunitaire. La tumeur se développe alors et devient cliniquement visible (Fig.5).

Plusieurs mécanismes d'échappement tumoral ont été caractérisés:

1.3.3.1 Perte de la reconnaissance de la tumeur par les cellules du système immunitaire

Afin d'éviter d'être repérées et éliminées par les cellules du SI inné et adaptatif, les cellules tumorales mettent en place plusieurs stratégies. Des études ont montré que les cellules tumorales pouvaient acquérir des défauts dans les voies d'apprêtement et de présentation antigéniques, ce qui facilite leur évasion au SI adaptatif. Par exemple, plusieurs études ont documenté une perte partielle ou totale d'expression des molécules du HLA de classe I dans de nombreuses tumeurs humaines (32, 33). L'altération d'autres protéines clés de la machinerie de présentation antigénique a aussi été observée, telles que les transporteurs peptidiques TAP 1 et 2 (*Transporter Associated with Antigen Processing*), la tapasine (*TAP-associated protein*), les sous unités de l'immunoprotéasome LMP-2 et LMP-7 ainsi que la β 2-microglobuline (34-41). De ce fait, l'expression des antigènes tumoraux peut également être altérée et empêcher la mise en place d'une réponse anti-tumorale spécifique (42). De plus, d'autres altérations

pouvant indirectement induire un défaut de présentation antigénique ont été identifiées. Par exemple, des études ont montré que certaines tumeurs développaient une résistance à l'IFN- γ en raison de l'apparition de mutations touchant des protéines impliquées dans la voie de signalisation en aval du récepteur à l'IFN- γ (43, 44). Enfin, la tumeur peut aussi exprimer des antigènes non-classiques du HLA de classe I, comme le HLA-G, qui inhibe les fonctions effectrices des cellules NK en se liant au récepteur inhibiteur LILRB1. Il a aussi été démontré que les molécules HLA-G solubles pouvaient induire l'apoptose des LT CD8⁺ *via* la voie Fas/Fas-L (45). D'autres molécules non classiques du HLA, telles que HLA-E et HLA-F peuvent également induire l'apoptose des cellules NK.

1.3.3.2 Résistance aux signaux de mort cellulaire

L'apoptose, appelée aussi mort cellulaire programmée, correspond à une succession d'événements qui entraînent la mort cellulaire, indispensable à l'homéostasie de l'organisme. Lorsque les récepteurs de mort cellulaire, Fas (CD95) et TRAIL, exprimés par la tumeur, se lient à leurs ligands, une cascade de signalisation aboutissant à l'apoptose, dite « indirecte », est activée. L'interaction Fas/FasL se traduit par l'activation d'une cascade de caspases, impliquant notamment la caspase-8. Certaines tumeurs expriment un inhibiteur de la caspase-8, la protéine cFLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*), les rendant ainsi résistantes à l'apoptose induite par Fas (46). Des mutations, voire une perte du gène codant Fas, ont également été décrites dans le myélome multiple (47) et le mélanome (48). L'apoptose induite par TRAIL est également souvent inhibée par les cellules tumorales, notamment suite à de nombreuses mutations ou perte d'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la cascade de caspases (49, 50). Aussi, l'oncogène bcl-2 codant la protéine anti-apoptotique Bcl-

2 est souvent surexprimé dans les lymphomes folliculaires (51). Enfin, les cellules tumorales peuvent aussi exprimer un inhibiteur du granzyme B (GZMB) produit par les cellules effectrices, le PI-9/SPI-6 bloquant ainsi son effet (52).

1.3.3.3 Production de molécules immunosuppressives

Les cellules tumorales peuvent inhiber la maturation et la fonction des cellules immunitaires *via* la production de molécules immunosuppressives soit par les cellules tumorales ou par les autres cellules qui composent le microenvironnement tumoral, telles que les cellules épithéliales et les cellules immunitaires. Nous nous limitons à mentionner brièvement certaines de ces molécules.

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), sécrété par de nombreuses tumeurs, est notamment connu pour son effet pro-angiogénique (53). Il peut inhiber la maturation et la différenciation des DC, en bloquant le facteur de transcription NF- κ B (54). En effet, une corrélation entre la diminution du nombre de DC et l'augmentation de VEGF a été observée dans les cancers du sein et du poumon (55). La neutralisation du VEGF avec un anticorps bloquant (bevacizumab) permet de limiter la progression de la maladie chez des patients atteints de carcinomes rénaux (56).

La cytokine IL-10 est souvent détectée dans le sérum de patients atteints de différents cancers et est associée à un mauvais pronostic (57). Elle peut inhiber la prolifération des LT CD4⁺ et la production des cytokines de la voie Th1, en particulier l'IFN- γ (58). L'IL-10 peut également directement restreindre l'activation et la fonction des LT CD8⁺ (59). D'autre part, l'IL-10 peut inhiber la différenciation et la fonctionnalité des DC différenciées à partir des

cellules souches hématopoïétiques (60). L'IL-10 inhibe la présentation antigénique et la production d'IL-12 et empêche par conséquent l'induction d'une réponse Th1 *in-vivo* (61). De plus, une étude a montré que l'IL-10 peut entraîner l'apoptose des DC (62) en augmentant leur sensibilité à la lyse par les cellules NK autologues (63). D'autre part, l'IL-10 peut réduire l'expression des molécules du CMH de classes I et II ainsi que la molécule d'adhésion ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) à la surface des tumeurs (64), les protégeant ainsi de la lyse par les CTL. Enfin, l'IL-10 peut induire l'anergie des LT en inhibant la voie de costimulation du CD28 sur ces cellules (65).

La prostaglandine E2e (PGE2) est un facteur pro-inflammatoire également exprimé par les cellules tumorales. Elle diminue la production de l'IL-12 par les lymphocytes et les macrophages et augmente celle de l'IL-10. L'inhibition de l'enzyme cyclo-oxygénase 2, qui catalyse la formation des prostaglandines, permet de diminuer la production de PGE2 et augmente la réponse anti-tumorale (66).

De fortes concentrations de la cytokine TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) peuvent être retrouvées chez des patients cancéreux, souvent associées à une progression de la maladie (67). Le TGF- β étant le sujet central de cette thèse, ses fonctions seront abordées dans le chapitre II de cette thèse.

D'autres cytokines, telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le CSF-1(*colony stimulating factor*) et l'IFN-I, peuvent aussi participer significativement à la progression tumorale (68, 69). De même, les enzymes immunosuppressives, telles que IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*), l'arginase, et IKK2 (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*) peuvent significativement contribuer à la progression de la tumeur (70) en agissant directement sur la

prolifération des cellules tumorales ou par l'induction de la tolérance/suppression des LT (71, 72).

D'autres facteurs, tels que les gangliosides tumoraux et l'antigène associé aux tumeurs RCAS1 (*receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells*) peuvent contribuer à la progression tumorale (73, 74). Des études ont montré que l'expression de RCAS1 était associée à l'apoptose des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs- *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) (75). De même, les antigènes gangliosidiques, sécrétés ou exprimés à la surface des cellules sont connus pour inhiber la fonction des CTL et des DC (76).

1.3.3.4 Les cellules régulatrices

Un des mécanismes majeurs de l'échappement tumoral à l'immunosurveillance est l'immunosuppression induite par les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ (Tregs) ou d'autres types de cellules immunosuppressives (77).

Les Tregs sont fréquemment retrouvés dans le sang périphérique et les tumeurs de patients cancéreux et leur fréquence accrue est généralement associée à un mauvais pronostic, probablement en raison de leur effet inhibiteur de la réponse anti-tumorale (78). Les Tregs peuvent inhiber la plupart des autres cellules immunitaires, comprenant les LT CD4⁺ et CD8⁺, les LB, les NK, les NKT et les cellules présentatrices d'antigènes (DC, monocytes, macrophages). L'effet inhibiteur des Tregs passe soit par des facteurs solubles (TGF- β , IL-10, IL-35, perforine et granzymes) ou par l'expression de molécules de surface (CTLA-4, LAG-3, CD39, neuropiline-1,..). Les Tregs inhibent la prolifération et la sécrétion de cytokines par les LT effecteurs, favorisent l'anergie des LB et altèrent leur production d'anticorps, inhibent

l'expression des molécules de costimulation, du CMH et les cytokines pro-inflammatoires par les APCs et réduit ainsi leur capacité à stimuler les LT. Les Tregs peuvent aussi augmenter le catabolisme du triptophane *via* IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) et peuvent inhiber les cellules cibles en sécrétant de la perforine et du granzyme. De plus, en rentrant en compétition avec les LT conventionnels pour l'IL-2, les Tregs inhibent leur activation et promeuvent leur apoptose (79).

Lors de la progression tumorale, un microenvironnement inflammatoire chronique, composé d'une multitude de signaux chimiques, s'établit. Des cellules immunitaires sont alors recrutées au site de la tumeur. A ce stade, la grande majorité des cellules immunitaires qui infiltrent la masse tumorale sont des cellules d'origine myéloïde, telles que les macrophages, les granulocytes et les MDSCs (*Myeloid derived suppressor cells*) (80). Les TAM passent du phénotype M1, qui initialement orchestre la réponse immunitaire contre les cellules tumorales, vers un phénotype M2 qui au contraire soutient la progression tumorale (81). Les MDSCs (*myeloid derived suppressor cells*) représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes caractérisées par une fonction immunosuppressive (82). L'accumulation des MDSCs est fréquemment observée dans différents cancers humains, ainsi que d'autres pathologies (83, 84). Elles sont générées dans la moelle osseuse et migrent vers la tumeur et les organes lymphoïdes secondaires en réponse aux chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5 (85). Les MDSCs inhibent la réponse anti-tumorale par différents mécanismes. Premièrement, elles sont capables d'induire le recrutement, l'activation et l'expansion des lymphocytes T régulateurs et ainsi inhiber la croissance tumorale (85, 86). Par la suite, les MDSCs peuvent dépleted le milieu en nutriments (déprivation de la cystéine, l'arginine et du tryptophan *via* un mécanisme dépendant de l'arginase-1 (ARG1)) essentiels aux LT (87), ce qui entraîne

l'inhibition de la chaîne δ du TCR et l'arrêt de la prolifération des LT activés (88). De plus, les MDSCs interfèrent avec la migration et la viabilité des LT en exprimant à leur surface ADAM17 (*ADAM metallopeptidase domain 17*), qui clive à la surface des LT des protéines clés dans leur migration vers les ganglions lymphatiques, et galectin-9 (GAL-9), qui induit l'apoptose des LT. Enfin, les MDSCs produisent des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), des oxydes nitriques (NO) et d'autres dérivés réactifs du nitrogène (RNS) par l'effet synergique des enzymes arginase (ARG1), NO synthase inductible (iNOS) et NADPH (89).

1.3.3.5 Induction de l'anergie et de l'épuisement des cellules T activées

La plupart des cellules tumorales n'expriment pas de molécules de co-stimulation et peuvent de ce fait induire l'anergie ou la tolérance des LT par l'engagement de leur TCR en absence de co-stimulation (90). De plus, la stimulation antigénique chronique des LT peut amener un état de différenciation effectrice terminale et/ou d'épuisement. Nous discuterons plus en détails des états de différenciation des LT dans la section suivante et allons ici nous attarder au phénomène d'épuisement.

D'autre part, l'activation des LT peut être atténuée par les points de contrôle inhibiteurs et leurs ligands exprimés par les LT eux-mêmes, les DC, les autres cellules immunitaires ou par les cellules tumorales. Les principaux points de contrôle inhibiteurs sont le CTLA-4 (antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques) et le PD-1 (*programmed cell death*), qui en association avec leurs ligands respectifs, le CD80 (B7.1) et le CD86 (B7.2) pour le CTLA-4 et le PD-L1 (B7 – H1) et PD-L2 (B7-DC) pour le PD-1, appartiennent tous à la superfamille des récepteurs du groupe B7 (91). Lorsque le CTLA-4 se lie à ses ligands, exprimés à la surface des DC, celui-ci rentre en compétition avec le CD28, exprimé par les lymphocytes T

effecteurs, et inhibe alors leur prolifération, la progression du cycle cellulaire et la synthèse de l'IL-2 (92, 93). De même, les cellules tumorales peuvent induire l'expression du PD-1 à la surface des LT spécifiques de la tumeur, qui après interaction avec ses ligands, exprimés à la surface des cellules tumorales ou d'autres cellules du microenvironnement tumoral, permet le recrutement des «SH2-domain containing tyrosine phosphatase» (SHP-1 et SHP-2) qui inhibent alors l'activité des molécules d'activation proximales du TCR ainsi que des molécules la voie de costimulation, telles que Zap70 et PI3K2 (94-97). PD-1 peut également induire l'expression de gènes connus pour inhiber l'activation des cellules T, tel que BATF (98). Ces différents mécanismes entraînent l'inhibition des fonctions effectrices des LT pouvant ainsi entraîner leur épuisement (99, 100).

D'autres récepteurs inhibiteurs peuvent être exploités par la tumeur pour inhiber la réponse anti-tumorale, tels que ILT3 et 4 (*Ig-like transcript-3 and -4*) (101, 102), Tim- 3 (*T cell Immunoglobulin Mucin Protein-3*) (103), LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*) (104, 105), VISTA (*V-domain Ig suppressor of T cell activation*) (104, 105) et BTLA (*B- and T-lymphocyte attenuator*) (106, 107). Bien que plusieurs mécanismes menant à l'inhibition des LT coexistent suite à la ligation de ces récepteurs, les plus connus impliquent les phosphatases SHP-1/SHP-2 qui déphosphorylent les intermédiaires de signalisation en aval du TCR (108) et du CD28 (97).

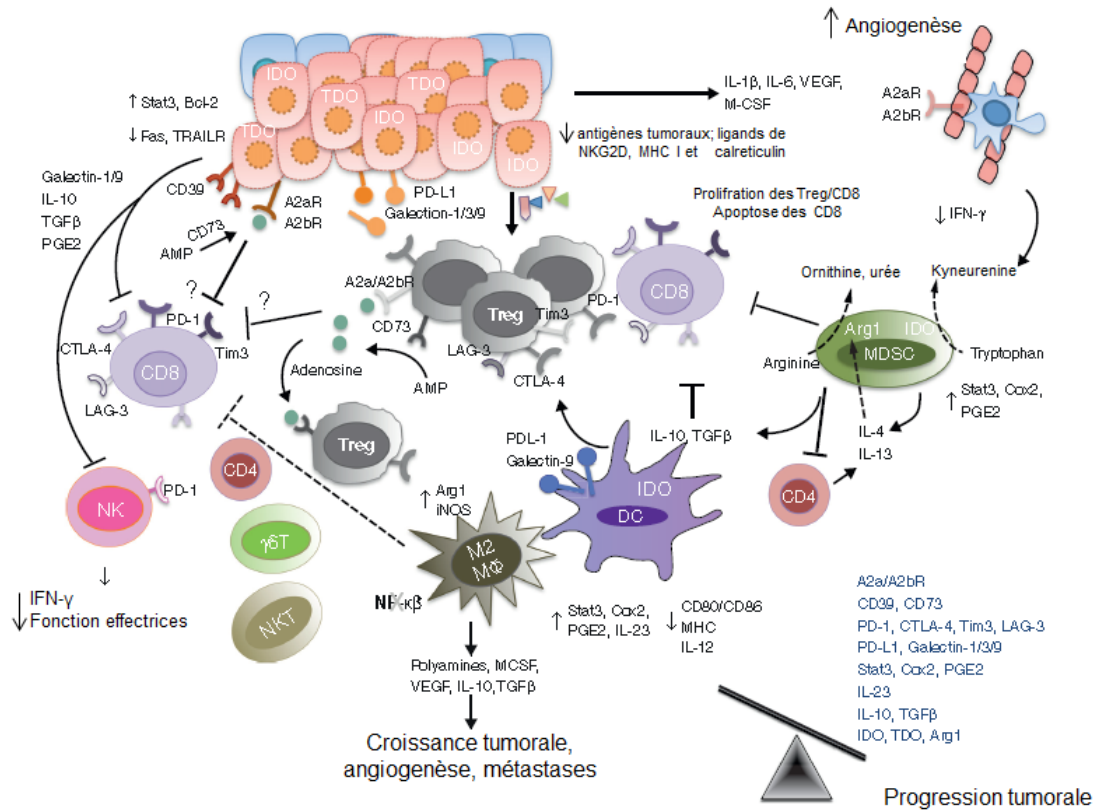


Figure 5: Les différents mécanismes de la phase d'échappement tumorale (adaptée de (16))

Tableau I. Le tableau répertorie les inhibiteurs les plus connus des fonctions des cellules T dans le microenvironnement tumoral. La liste n'est pas exhaustive car d'autres facteurs de blocage peuvent être présents. Chaque tumeur développe sa propre signature immunosuppressive et le degré de dysfonctionnement des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral varie largement d'une tumeur à l'autre en fonction de la signature prédominante. Abréviations: PGE2, Prostaglandine E2; TA, antigène tumoral; TCR, récepteur des lymphocytes T (adapté de (109)).

Facteurs/cellules/produits cellulaires	Effets sur les cellules T	Immunothérapies potentielles
<p>Ligands des récepteurs inhibiteurs</p> <p>Facteurs solubles : IL-10 IL-35 TGF-β IDO Galactine 9 Arginase COX-2/PGE2 Adénosine Radicaux oxygénés</p> <p>Cellules régulatrices : iTReg MDSC</p> <p>Exosomes inhibiteurs dérivés de la tumeur</p> <p>Perte/diminution MHC de classe I; inactivation de la β2-microglobuline sur les cellules tumorales</p> <p>Points de contrôles métaboliques, e.x., dérivation en glucose</p>	<p>Épuisement des LT <i>via</i> la signalisation des récepteurs inhibiteurs, ainsi que par la stimulation chronique du TCR par les TA.</p> <p>Seuls ou en coopération avec le PD-1, ils inhibent la fonction des LT CD8⁺ spécifiques des TA <i>via</i> différentes voies moléculaires</p> <p>Inhibition des fonctions effectrices des LT de façon dépendante ou indépendante du contact cellulaire. Libération de protéines inhibitrices, de médiateurs induisant la mort cellulaire ou de radicaux oxygénés</p> <p>Des signaux négatifs inhibent les fonctions des LT effecteurs, mais promeuvent l'expansion des cellules régulatrices et le transfert des miRNA inhibiteurs</p> <p>Interfère avec la présentation antigénique en inhibant la machinerie de présentation antigénique de la tumeur et la reconnaissance tumorale par les LT</p> <p>Limite la glycolyse aérobie des TIL; inhibition de la voie mTOR et la capacité à produire de l'IFN-γ</p>	<p>Inhibition des points de contrôle inhibiteurs : restauration complète ou partielle de la fonction des LT se traduisant par des réponses cliniques.</p> <p>Anticorps neutralisant; Anticorps bloquant/ciblant des récepteurs, inhibiteurs pharmacologiques; blocage sélective par des médicaments</p> <p>Déplétion des TReg et des MDSC ou de leurs activités suppressives par des anticorps bloquant, des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires ou par des agents pharmaceutiques</p> <p>Élimination des exosomes (plasmaphérèse); blocage de la signalisation ou l'inhibition de la relâche des exosomes</p> <p>Induction de l'expression du CMH-I par l'IFN-γ ou d'autres immunothérapies</p> <p>Augmentation de métabolites régulant la glycolyse aérobie dans le microenvironnement tumoral</p>

1.4 L'immunothérapie du cancer

Les traitements conventionnels, tels que la chimiothérapie, la radiothérapie et certaines biothérapies ciblées représentent la première ligne de traitement contre le cancer. Toutefois, l'efficacité de ce type de traitement reste limitée en raison, notamment, de leur faible sélectivité, le développement d'une résistance au traitement chez certains patients et l'incapacité à traiter efficacement les cancers métastatiques, sans oublier les nombreux effets secondaires qui leur sont associés. Mais grâce aux avancées majeures dans le domaine de l'immunologie tumorale, une nouvelle forme de thérapie anticancéreuse, plus ciblée et souvent moins toxique, a vu le jour : l'immunothérapie. Cette thérapie vise à revigorer le SI du patient pour lui permettre de combattre plus efficacement et durablement la tumeur.

Cependant, cette tâche peut s'avérer ardue car, comme nous l'avons vu dans les précédents paragraphes, la tumeur élabore de nombreuses stratégies pour échapper au SI; des stratégies impliquant parfois des agents du SI lui-même. Toutefois, les avancées majeures dans la compréhension de ces mécanismes ont permis de développer des approches d'immunothérapies, qui sont plus ciblées et moins toxiques, et qui pour certaines, visent à contourner ces mécanismes. Depuis, plusieurs stratégies d'immunothérapies ont été proposées et testées dans des modèles animaux et en clinique. Elles sont classées en deux catégories: les traitements d'immunothérapie actifs et les traitements passifs. L'immunothérapie passive consiste à administrer aux patients des agents thérapeutiques, tels que des anticorps monoclonaux, des lymphocytes ou des cytokines, dans le but d'améliorer ou de restaurer une réponse anti-tumorale préexistante chez le patient. L'immunothérapie active tente, quant à elle, de stimuler une réponse anti-tumorale chez les patients afin d'éliminer la tumeur, en utilisant

des approches, telles que la vaccination, l'immunomodulation non spécifique, ou le ciblage spécifique des récepteurs d'antigènes (110).

Dans cette partie, nous allons décrire les approches d'immunothérapie les plus prometteuses, telles que la vaccination, la virothérapie oncolytique, l'inhibition des points de contrôle immunitaires et, plus particulièrement, l'immunothérapie adoptive, qui est en lien direct avec les travaux de cette thèse.

1.4.1 La vaccination

Lorsque l'on a compris que le SI était capable de distinguer les cellules tumorales des cellules saines et que les LT pouvaient reconnaître spécifiquement la tumeur et la détruire, les scientifiques ont tenté de mettre au point des vaccins pour activer le SI du patient et induire une réponse anti-tumorale. Deux types de vaccins anticancéreux ont été développés: les vaccins prophylactiques et les vaccins thérapeutiques (111). Les vaccins prophylactiques sont utilisés pour prévenir l'apparition de la maladie chez des personnes saines et ont pour la majorité été développés contre des virus oncogéniques. Plusieurs antigènes viraux ont, en effet, été identifiés dans des cancers induits par des virus, tels que dans les cancers cervicaux associés au Virus du Papillome humain (VPH), les carcinomes hépatiques associés au virus de l'hépatite B (VHB) ou encore les sarcomes de Kaposi associés à l'Herpèsvirus humain de type 8. Les vaccins testés contre le VPH et l'HBV semblent être efficaces et ont permis de réduire significativement la prévalence des cancers qui leurs sont associés (111). Par exemple, le Gardasil (Merck) et Cervarix (GlaxoSmithKline) confèrent une protection efficace contre les infections chroniques à VPH de types 16 et 18, les néoplasies intra-épithéliales cervicales et les adénocarcinomes *in situ* du col utérin (112).

Les vaccins thérapeutiques sont quant à eux utilisés pour traiter des patients déjà atteints par la maladie. Ils ont été conçus pour éliminer les cellules cancéreuses exprimant des antigènes tumoraux en renforçant la réponse immunitaire du patient, en particulier les réponses à médiation cellulaire T CD8⁺ (113, 114). Les différentes classes de vaccins anticancéreux comprennent les vaccins peptidiques, les vaccins cellulaires (lysat ou cellules cancéreuses, cellules dendritiques), les vaccins génétiques (vecteur viral, ADN, ARN messenger) et les vaccins à base d'hydrates de carbone (115). Ces vaccins comprennent en général deux parties: l'antigène tumoral ciblé et un adjuvant visant à optimiser la réponse immunitaire en favorisant le recrutement et la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (APC), notamment les DC (115). Une fois chargées d'antigènes, ces APC traversent le vaisseau lymphatique afférent jusqu'aux ganglions lymphatiques, où ils interagissent avec les LT et les activent. Les LT activées migrent ensuite à travers le vaisseau efférent, le canal thoracique et le sang pour atteindre les cellules tumorales (113).

Malgré les progrès considérables dans le domaine de la vaccinothérapie durant les deux dernières décennies, celle-ci ne s'est pas encore imposée dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux. A ce jour, seul le vaccin thérapeutique, Sipuleucel-T (à base de cellules dendritiques) a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) et a permis de prolonger la vie de plusieurs patients atteints d'un cancer avancé de la prostate (116). Parmi les autres vaccins anticancéreux ayant montré des améliorations cliniques dans des essais de phase 3 randomisés, nous citons un vaccin contre le mélanome avec le peptide gp100 (117) et un vaccin contre le lymphome avec une protéine idiotypique (118). Cependant, les bénéfices cliniques induits par ces vaccins restent modestes dans les trois essais de phase III.

La découverte de nouvelles cibles antigéniques pourraient ouvrir la voie au développement de nouveaux vaccins anticancéreux plus efficaces et plus ciblés. A cet effet, la découverte des néo-antigènes, des peptides spécifiques de chaque tumeur résultants de mutations somatiques survenues au cours de l'oncogenèse (119), constitue une avancée majeure dans le domaine. Ces antigènes ont pour avantage d'être spécifiques aux tumeurs, ils sont susceptibles d'avoir une plus grande avidité et présentent un risque réduit, voire nul, de déclencher des réactions auto-immunes (120), ce qui fait d'eux une cible de choix pour les vaccins thérapeutiques. Une étude récente réalisée par l'équipe du Dr. Claude Perreault, de l'Université de Montréal, a permis d'identifier 40 nouveaux antigènes spécifiques de tumeurs, dont 90% seraient codés par les régions non codantes de notre ADN (121). Ces régions recèleraient donc la grande majorité des néo-antigènes tumoraux qui, une fois identifiés et testés pour leur immunogénicité, pourraient révolutionner l'avenir des vaccins thérapeutiques car il sera possible de générer des vaccins anticancéreux personnalisés qui seront probablement beaucoup plus puissants que les vaccins traditionnels utilisant des antigènes associés aux tumeurs. Plusieurs études ont déjà démontré que cette stratégie vaccinale personnalisée permettait d'induire des réponses immunitaires antitumorales robustes et/ou un rejet de la tumeur chez l'homme et la souris (122-124).

Un autre paramètre susceptible d'influencer l'efficacité des vaccins thérapeutiques est le choix de la voie d'administration du vaccin. Une étude récente a montré que l'administration d'un vaccin par voie muqueuse (nasale, par exemple) dans le cadre des cancers muqueux (exp. ORL) permettrait de mobiliser une meilleure réponse CD8⁺ anticancéreuse localement, comparée à la voie systémique et ce, notamment grâce à la génération de cellules mémoires résidant dans les tissus (Trm) (125).

1.4.2 L'inhibition des points de contrôle immunitaire

Il existe de nombreuses preuves, aussi bien dans des modèles expérimentaux que chez l'humain, que les LT CD8⁺ présents dans le MT deviennent épuisés/dysfonctionnels lorsqu'ils sont exposés de façon chronique à l'antigène. Bien que ces LT épuisés semblent encore capables d'exercer des fonctions lytiques (126), ils présentent toutefois une capacité réduite à proliférer et à produire des cytokines (127). Les LT CD8⁺ épuisés dans le MT régulent positivement un certain nombre de récepteurs inhibiteurs (points de contrôle immunitaires) (106) qui se lient à leur ligands exprimés par des cellules tumorales et des cellules présentatrices d'antigène dans le MT (128), y compris PD-1, CTLA-4, Tim-3 (103), LAG-3, BTLA (129) et TIGIT (130). Ces récepteurs qui inhibent les fonctions effectrices des TILs représentent donc une cible thérapeutique intéressante en immunothérapie du cancer pour restaurer la réponse anti-tumorale. En 2011, la FDA a approuvé le premier inhibiteur des points de contrôle, l'ipilimumab/Yervoy (anti-CTLA-4), comme première ligne de traitement contre le mélanome métastatique, en se basant sur les résultats prometteurs des premières études précliniques qui ont montré une prolongation de la vie des patients traités (131-133). Depuis, la FDA a approuvé de nombreux autres inhibiteurs de points de contrôle pour le traitement d'un large spectre de tumeurs malignes (134), tels que l'anti-PD-1 (nivolumab/Opdivo et pembrolizumab/Keytruda), et l'anti-PDL-1 (atezolizumab et avelumab), qui sont associés à une toxicité réduite comparés aux anti-CTLA-4. Plus récemment, un essai clinique associant un traitement avec un anti-CTLA-4 et anti-PD-1 a démontré une régression tumorale chez 50% des patients traités atteints de mélanome avancé, avec dans la plupart des cas une régression tumorale de 80% ou plus (135). D'autres essais cliniques ciblant simultanément le CTLA-4 et le PD-1 dans d'autres types de cancers sont actuellement en cours

avec des résultats préliminaires plutôt prometteurs et évoquant un grand potentiel pour les approches de combinaisons (136).

L'immunothérapie par les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires connaît un tel succès qu'elle a valu cette année (2018) le prix Nobel de physiologie et médecine aux deux immunologistes, James Allison, et Tasuku Honjo, pour les récompenser de leur découverte des récepteurs inhibiteurs CTLA-4 et PD-1, respectivement, et leur implication dans cette thérapie.

Bien que les inhibiteurs de points de contrôle en monothérapie ou en combinaison connaissent un succès fulgurant, grâce à leur efficacité relativement durable dans différents types de cancer, leur efficacité reste limitée à certains patients et peut entraîner des effets indésirables, incluant des toxicités auto-immunes gastro-intestinales, dermatologiques, endocriniennes et hépatiques, ainsi que d'autres événements inflammatoires moins courants (137).

En plus d'augmenter l'expression des récepteurs inhibiteurs, les CD8⁺ du MT semblent également réguler positivement l'expression d'un certain nombre de récepteurs activateurs, comme 4-1BB, OX40 et GITR (*glucocorticoid-induced TNFR family related gene*) (138). Ces derniers sont des membres de la famille du TNFR qui peuvent facilement stimuler les fonctions des LT lors de leur liaison à leurs ligands. L'utilisation d'anticorps agonistes de ces récepteurs montrent des effets thérapeutiques prometteurs dans des modèles de tumeurs chez la souris et sont en cours de développement pour des essais cliniques (139-141). De plus, des études précliniques montrent que l'utilisation de ces agents agonistes en combinaison avec les inhibiteurs de points de contrôle ont un effet synergique.

1.4.3 Le virothérapie oncolytique

La virothérapie consiste à administrer aux patients cancéreux des virus à réplication active qui ont un tropisme naturel ou induit aux cellules tumorales (142). L'idée d'utiliser des virus comme agents thérapeutiques contre le cancer remonte au début du 20^{ème} siècle où l'on observait des régressions spontanées de différentes tumeurs suite à une infection virale (143-145). Mais ce n'est qu'au cours des dernières décennies que la virothérapie a réellement émergé comme un traitement potentiel alternatif contre le cancer, grâce aux avancées majeures dans le domaine de la virologie, la biologie des tumeurs et la biologie moléculaire. Cette thérapie se base sur la capacité de certains virus à infecter et lyser spécifiquement des cellules tumorales, en exploitant des voies de signalisations altérées dans ces cellules (146), tout en épargnant les cellules saines (147, 148). Les virus oncolytiques se répliquent dans les cellules malignes et entraînent leur mort via deux mécanismes principaux: la réplication sélective dans les cellules cancéreuses, entraînant la lyse directe de ces dernières et l'induction d'une réponse anti-tumorale systémique (149). En effet, lorsque le virus infecte la cellule tumorale, il s'y réplique et la lyse, libérant ainsi plusieurs clones viraux pouvant infecter les cellules adjacentes ainsi que des antigènes tumoraux, des PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) et des DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) susceptibles de recruter et d'activer des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (150). Ainsi, une réponse spécifique contre les antigènes tumoraux se met en place permettant d'éliminer à la fois les tumeurs infectieuses et les métastases (135). Certains virus possèdent un tropisme naturel pour les cellules malignes, tels que les réovirus et les parvovirus autonomes. D'autres, tels que les adénovirus, sont génétiquement modifiés pour les rendre capables d'infecter les cellules tumorales (151). A ce jour, plus d'une vingtaine de virus oncolytiques ont été caractérisés, tels

que le Poliovirus utilisé pour traiter les glioblastomes (152), le virus Picornavirus Seneca Valley (Picornavirus et le virus Seneca Valley) qui peut infecter les tumeurs du poumon à petites cellules (153) ainsi que le virus de l'herpès et le virus de la vaccine qui peuvent induire indirectement la mort des cellules tumorales en stimulant une réponse immunitaire adaptative (154-156). Plusieurs thérapies de combinaison associant la virothérapie à d'autres thérapies anticancéreuses ont été envisagées afin d'améliorer leur effet anti-tumoral (157). Par exemple, il a été démontré que le traitement par un adénovirus exprimant un mini-anticorps qui bloque PDL1 améliore la réponse anti-tumorale des CAR-T dans un modèle de xénogreffe d'un cancer humain de la prostate (158). De plus, en 2015 la FDA a approuvé l'utilisation d'une forme modifiée du virus de l'Herpes, T-VEC (*talimogene laherparepvec*), qui exprime en outre du GM-CSF, pour le traitement des patients atteints de mélanomes avancés (159). Des études récentes ont montré que l'association de ce virus oncolytique avec un anticorps bloquant le CTLA-4 (160) ou le PD-1 (161) induisait des résultats très prometteurs avec une rémission complète chez un grand nombre de patients. D'autres études ont montré que certains oncovirus pouvaient sensibiliser les cellules tumorales aux traitements conventionnels comme la chimio- ou la radiothérapie (162).

La thérapie par les virus oncolytiques semble avoir un avenir très prometteur pour le traitement du cancer, du fait de sa spécificité, son efficacité et sa sécurité. Des ajustements au niveau de la dose administrée, du mode d'administration (injection intratumorale ou intravasculaire) et du spectre de tumeurs sensibles au traitement doivent être pris en considération afin d'optimiser l'efficacité de cette thérapie.

1.4.4 L'immunothérapie adoptive (IA)

L'immunothérapie adoptive consiste à injecter au patient cancéreux des cellules immunitaires (exp. CD8⁺, NK, gamma-delta [$\gamma\delta$]), le plus souvent des LT spécifiques des tumeurs, dans le but d'obtenir un effet thérapeutique. Ces LT sont d'abord prélevés à partir du patient lui-même (biopsie, sang périphérique,..), puis après plusieurs étapes de clonage, d'amplification et de sélection *ex-vivo*, ces LT lui sont réinjectés. Les LT peuvent aussi être modifiés génétiquement pour exprimer un TCR transgénique ou un récepteur chimérique avant d'être ré-infusés au patient.

L'histoire de l'IA a commencé dans les années 50, avec celle de la greffe de moelle osseuse (GMO), mise au point par Donald Thomas, prix Nobel de médecine en 1990. Après avoir reçu de fortes doses de chimio- ou de radio-thérapie, les patients leucémiques recevaient une greffe de moelle osseuse à partir d'un donneur sain (greffes allogéniques). A cette époque, les succès étaient très modestes et souvent accompagnés de graves complications, telle que la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD- *Graft versus host disease*). En effet, un greffon hématopoïétique contient des cellules souches totipotentes, ainsi que des cellules T immunocompétentes responsables de l'effet bénéfique dit "GvL" (*Graft versus Leukemia*), en reconnaissant et détruisant les cellules malignes résiduelles du receveur, mais aussi de l'effet délétère GVHD, en reconnaissant et détruisant les tissus sains du receveur.

La découverte du typage HLA dans les années 60, a permis aux médecins d'identifier au sein d'une même famille les individus qui seraient les plus compatibles pour la greffe de moelle osseuse, limitant ainsi les effets délétères de la GMO allogénique. Dans les années qui ont suivi, l'efficacité de cette thérapie a été démontrée dans de nombreuses hémopathies. Plus

récemment, l'apparition des banques de donneurs de moelle osseuse non apparentés ainsi que les donneurs alternatifs (greffes de sang placentaire et greffons haplo-identiques) a rendu accessible l'application de cette thérapie à des patients n'ayant pas de donneurs compatibles.

Les essais cliniques démontrent aujourd'hui l'efficacité de cette thérapie dans les cancers hématologiques, toutefois, des optimisations doivent être réalisées afin d'étendre son application aux cancers solides. Pour traiter les tumeurs non hématologiques, des stratégies plus récentes se sont basées sur l'utilisation de LT autologues.

Depuis les premiers essais cliniques, l'IA n'a cessé d'évoluer au rythme des avancées scientifiques et technologiques. Grâce à la découverte, notamment, des LT infiltrant les tumeurs, des conditionnements à toxicité réduite et à l'identification de nombreux antigènes tumoraux, de nouvelles stratégies plus personnalisées tendent à remplacer la greffe traditionnelle. Ces stratégies innovantes reposent sur le transfert des LT du donneur, l'éducation *ex-vivo* de LT spécifiques des tumeurs et la modification génétique *ex vivo* du TCR afin d'obtenir des récepteurs chimériques capables de cibler la cellule tumorale.

Il existe trois sources possibles de cellules T spécifiques de la tumeur pour l'immunothérapie adoptive. Les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL), naturellement enrichis en LT spécifiques de la tumeur, peuvent être amplifiés de façon non spécifique *in vitro*, puis réintroduits dans leur hôte d'origine. Pour les patients chez lesquels les TIL ne peuvent être cultivés, une réponse anti-tumorale spécifique peut être obtenue par l'expansion de LT polyclonaux de façon antigène spécifique ou par leur modification génétique. Jusqu'ici, les plus grands succès ont été obtenus avec les TIL, mais la génération de lignées spécifiques

de l'antigène ou la modification génétique de LT sont des approches prometteuses qui permettraient d'élargir l'applicabilité de l'IA à un plus grand nombre de patients.

1.4.4.1 Les TILs

A ce jour, l'une des thérapies les plus efficaces contre les mélanomes métastatiques est le TA de LT autologues du patient, isolés à partir de biopsies de tumeurs, amplifiés ex-vivo avant d'être réinjectés au patient. Le transfert adoptif de TILs a été décrit pour la première fois en 1988 par l'équipe de Steven Rosenberg (163) et a depuis donné des résultats très satisfaisants, atteignant parfois des réponses cliniques chez plus de 50% des patients traités (164), dont certains durent plusieurs années dans les essais cliniques les plus récents (165-168).

De nombreuses études de phases I/II sont actuellement en cours à travers le monde afin d'évaluer l'efficacité de ce traitement dans différents types de cancers, tels que le carcinome ovarien, les néoplasies liées au Papillomavirus humain (HPV), et les tumeurs gastro-intestinales. Le mélanome étant porteur d'un grand nombre de mutations et par conséquent reconnu comme étant plus immunogène que d'autres tumeurs, il est possible que les succès ne se répètent pas dans d'autres histologies.

Bien que la thérapie par les TILs ait donné des résultats très prometteurs lors d'essais de phase 1 et 2 (167, 169), son application à un plus grand nombre de patients reste limitée en raison, du manque de disponibilité de biopsies de tumeurs, de la difficulté à isoler et à amplifier des TILs viables, ou à l'incapacité de démontrer une réponse spécifique à partir des TILs isolés.

Afin d'améliorer l'efficacité et la sécurité de l'IA et de pouvoir étendre son application à d'autres types de cancers, les chercheurs ont eu l'idée de rediriger la spécificité des LT conventionnels *via* l'intégration dans ces cellules de gènes qui codent soit pour un TCR conventionnel choisi ou pour un récepteur chimérique (CAR- *Chimeric Antigen Receptor*).

1.4.4.2 Les TCR transgéniques (TCR-Tg)

Le récepteur naturel des LT (TCR- *T cell receptor*) est composé de deux chaînes polypeptidiques α et β , associées à un complexe protéique composé des chaînes CD3 ϵ , δ et ζ , qui assurent la transduction du signal d'activation lors de la reconnaissance par les LT de peptides présentés spécifiquement par le CMH. Afin de générer des TCR transgéniques, les scientifiques doivent d'abord isoler un clone de LT qui présente une forte affinité pour une cible antigénique. Ce clone peut être isolé soit à partir du patient lorsqu'il est en rémission (170), soit à partir d'une souris humanisée immunisée avec des antigènes tumoraux humains (171, 172), ou encore par la technique de phage display (173). Par la suite, les gènes codant pour les chaînes α et β du TCR du clone de LT sélectionné sont isolées et clonées dans un vecteur d'expression génique (γ -rétrovirus ou lentivirus) qui peut dès lors être introduit dans les LT du patient, lors de la phase d'activation et d'expansion *ex-vivo* des LT, leur confèrent ainsi une spécificité antitumorale.

L'équipe de Steven Rosenberg a été la première à reprogrammer des LT avec un TCR-Tg ciblant MART-1 (MART-*melanoma antigen recognized by T cells*) (174). Quelques années plus tard, ces travaux pionniers ont donné lieu à une première étude clinique d'immunothérapie par transfert de LT à TCR-Tg chez des patients atteints de mélanome, mais qui n'a révélé qu'une faible expression du TCR-Tg *in vivo* (175). Ceci était probablement dû à

l'expression du TCR endogène et de TCRs croisés, réduisant ainsi l'expression du TCR-Tg souhaité et, par conséquent, son efficacité thérapeutique. En effet, les LT-TCR-Tg sont capables d'exprimer à la fois le TCR transgénique et le TCR endogène du LT. Ceci peut conduire à un appariement croisé des chaînes α et β des deux TCR, aboutissant à la formation de nouveaux clones de LT avec une spécificité inconnue, pouvant provoquer une réaction auto-immune. Depuis, des stratégies ont été développées afin d'améliorer l'affinité du TCR-Tg. Par exemple, en favorisant l'expression du TCR-Tg à la surface des cellules ou par la substitution d'un seul ou de deux acides aminés dans la région variable des chaînes α ou β du TCR-Tg, ce qui a permis d'améliorer la réactivité des LT (168, 176, 177). Depuis, Cette approche a prouvé son efficacité clinique, notamment dans le mélanome, le cancer colorectal et le sarcome synovial (175, 178).

Cette stratégie présente l'avantage de pouvoir à la fois cibler des antigènes tumoraux membranaires et intracellulaires. Parmi les antigènes intracellulaires qui peuvent être ciblés par les TCR-Tg, certains, comme la télomérase, sont directement impliqués dans le processus d'oncogenèse et représentent par conséquent des cibles de choix (179, 180). Toutefois, la faible avidité du TCR-Tg pour sa cible antigénique et sa restriction aux molécules du CMH constituent toujours une limite pour cette thérapie et restreignent son application à un nombre limité de patients. De plus, des tentatives pour augmenter l'affinité d'un TCR contre un antigène dérivé de MAGE-3 ont mené à des réactivités inattendues et fatales dans 2 études cliniques différentes, soulevant plusieurs questions quant à la faisabilité d'utiliser des TCR modifiés (181, 182).

1.4.4.3 Les récepteurs antigéniques chimériques (CARs)

Durant la dernière décennie, nous avons assisté à l'émergence d'une nouvelle forme d'IA, appelée la thérapie par les CAR-T (*Chimeric antigen receptor T cell*). Cette thérapie est une approche personnalisée qui consiste à modifier génétiquement les LT autologues du patient afin qu'ils expriment un récepteur antigénique chimérique, permettant de reconnaître et de cibler spécifiquement les antigènes non-liés au CMH et exprimés à la surface des tumeurs.

Un CAR est constitué d'une partie extracellulaire représentée par le fragment scFv dérivé de la chaîne variable d'un anticorps, d'une région transmembranaire charnière qui permet la transduction du signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et qui confère une certaine flexibilité au fragment scFv et d'une partie intracellulaire constituée généralement d'un ou de plusieurs domaines de signalisation (183). L'introduction des CARs dans des LT a été, jusque-là, réalisée par l'usage de rétrovirus-gamma (184), de lentivirus (185) et d'ARNm (186). Toutefois, d'autres approches non virales, tels que le système transposon-transposase (187) et la technologie CRISPRcas (*CRISPR- clustered regularly interspaced palindromic repeat*) (188) sont en cours de développement.

Les cellules CAR-T présentent plusieurs avantages par rapport aux TCR Tg. Ils peuvent notamment reconnaître les tumeurs de façon indépendante des molécules du CMH. Cependant, jusqu'à maintenant seules les néoplasies des lymphocytes B ont pu être ciblées. La principale raison pour cela est qu'il est possible d'éliminer à la fois les lymphocytes B malins et bénins sans compromettre la survie du patient (sous réserve d'une supplémentation en gamma-globulines).

Les premiers CAR-T développés, dits de "première génération", ne contenaient qu'un seul domaine de signalisation comprenant soit la chaîne CD3 ζ ou FcR γ . De ce fait, ils induisaient une réponse anti-tumorale peu efficace en raison d'une production sous optimale de cytokines et d'une faible prolifération de ces LT *in vivo*. Par la suite, les chercheurs ont développés des CAR-T de deuxième génération, contenant, en plus des chaînes CD3 ζ du TCR, des domaines de co-stimulation, tels que le CD28, le 4-1BB, le CD27, OX40 ou ICOS, qui confèrent au CAR-T un signal plus fort et une meilleure persistance *in vivo*. Enfin, une troisième génération de CAR-T, contenant cette fois-ci 3 domaines de stimulation, a été élaborée. Toutefois, leur utilisation nécessite encore d'être validée en clinique (189). Une quatrième génération de CAR-T, appelés aussi TRUCK-T, a été développée. En plus de contenir le transgène des CARs, ces cellules contiennent un deuxième transgène, le gène inducible d'une cytokine stimulatrice suite à l'activation du TCR, telle que l'IL-12 (190, 191).

La thérapie par les CAR-T (ciblant généralement le CD19) a récemment montré des résultats remarquables chez des patients atteints de cancers hématologiques (185, 192-195). Cependant, leur efficacité reste très limitée dans les tumeurs solides, comme les cancers épithéliaux, principalement en raison de l'absence de cibles antigéniques exprimées exclusivement par la tumeur dans ces cancers et absent sur des tissus vitaux (196). L'identification de nouveaux biomarqueurs plus spécifiques est une étape importante pour le succès de cette thérapie dans les cancers solides. Aussi, le développement de nouvelles stratégies pour optimiser notamment la sélection de nouveaux domaines variables, la construction des vecteurs ainsi que les méthodes de transduction cellulaire, sont nécessaires pour améliorer l'efficacité de la thérapie par les CAR-T en général.

Malgré le succès impressionnant de la thérapie par les CAR-T, plusieurs effets indésirables lui sont associés. Ces derniers peuvent survenir assez rapidement, dans les heures qui suivent leur injection au patient. Parmi les plus courants et les plus sévères, on cite le syndrome de libération cytokinique, le syndrome d'activation macrophagique et le déclenchement d'une réaction auto-immune due au fait que l'expression de la cible antigénique du CAR n'est pas restreinte aux cellules tumorales (197).

Pour mieux maîtriser l'apparition de cette dernière, plusieurs stratégies ont été envisagées. Par exemple, l'utilisation du système du gène suicide qui permet d'éliminer spécifiquement les LT transgéniques en cas d'apparition des effets secondaires. Les gènes suicides les plus utilisés sont : la thymidine kinase de l'Herpès Simplex (HSV-TK), la caspase 9 inducible (iCasp9) et le CD20 (198-200). D'autre part, les CARs peuvent être génétiquement modifiés pour reconnaître deux ou plusieurs antigènes tumoraux afin qu'ils puissent discriminer les tissus sains des tissus malins. Un des exemples est l'utilisation des "*split-signal CARs*" qui limitent l'activation des LT uniquement au contact de la tumeur (201, 202). Une autre approche inclut les CARs en tandem (TanCARs) qui expriment deux domaines variables capables de reconnaître deux antigènes tumoraux distincts sur une même cellule, augmentant ainsi non seulement leur spécificité, mais aussi leur efficacité thérapeutique (203). Une autre stratégie alternative consiste à co-exprimer un CAR avec le domaine de signalisation d'une molécule inhibitrice des LT (*iCARs*), telle que PD-1 ou CTLA4 et qui restreint l'activation des LT en absence d'un signal activateur (204).

On l'aura donc compris, l'identification de nouvelles cibles antigéniques, dont l'expression serait soit exclusivement restreinte aux cellules tumorales ou partagée avec des

cellules saines indispensables au fonctionnement de l'organisme (exp. CD19 et CD20), pourrait élargir l'applicabilité et améliorer l'efficacité de la thérapie par les CAR-T. A cet égard, les néo-antigènes pourraient constituer une cible alternative intéressante, si l'on choisit d'ignorer le coût économique que leur utilisation engendrerait.

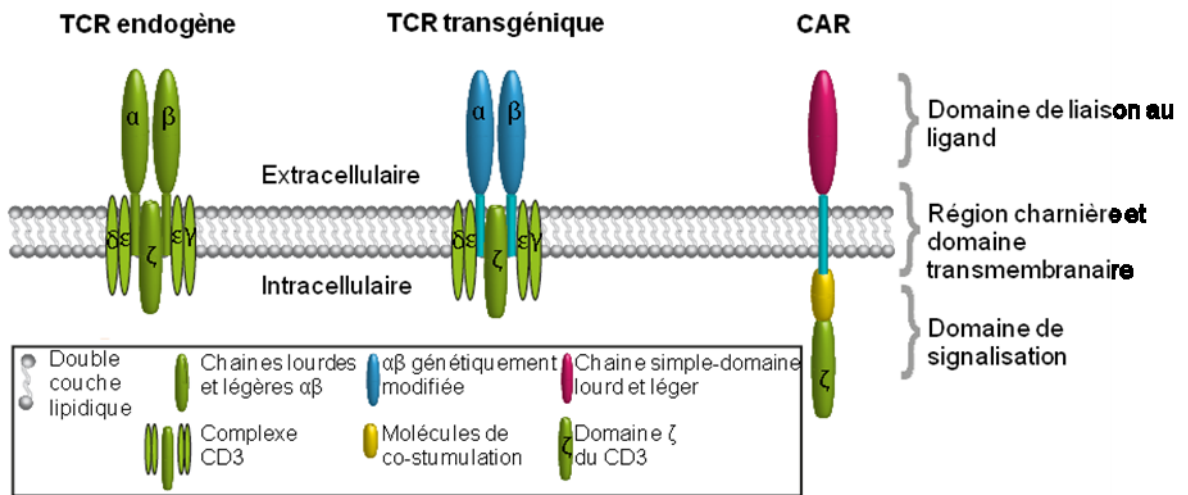


Figure 6: Schéma représentant les différents composants du TCR endogène, d'un TCR et d'un CAR génétiquement modifiés (adaptée de (205))

1.4.4.4 Paramètres qui déterminent le succès de l'IA

L'efficacité de l'IA repose sur plusieurs facteurs déterminants. Parmi ces facteurs on cite : la spécificité du TCR pour l'antigène tumoral, une activation et une expansion efficace des LT pour en obtenir un nombre satisfaisant à injecter au patient. D'autre part, ces cellules doivent être capables de migrer au site de la tumeur et de contourner leur microenvironnement immunosuppresseur afin de pouvoir libérer leurs produits cytotoxiques et ainsi éliminer la tumeur. De plus, une persistance suffisamment longue de ces cellules dans l'organisme du

receveur est souhaitable car ça permettrait de lui offrir une protection durable contre une rechute potentielle.

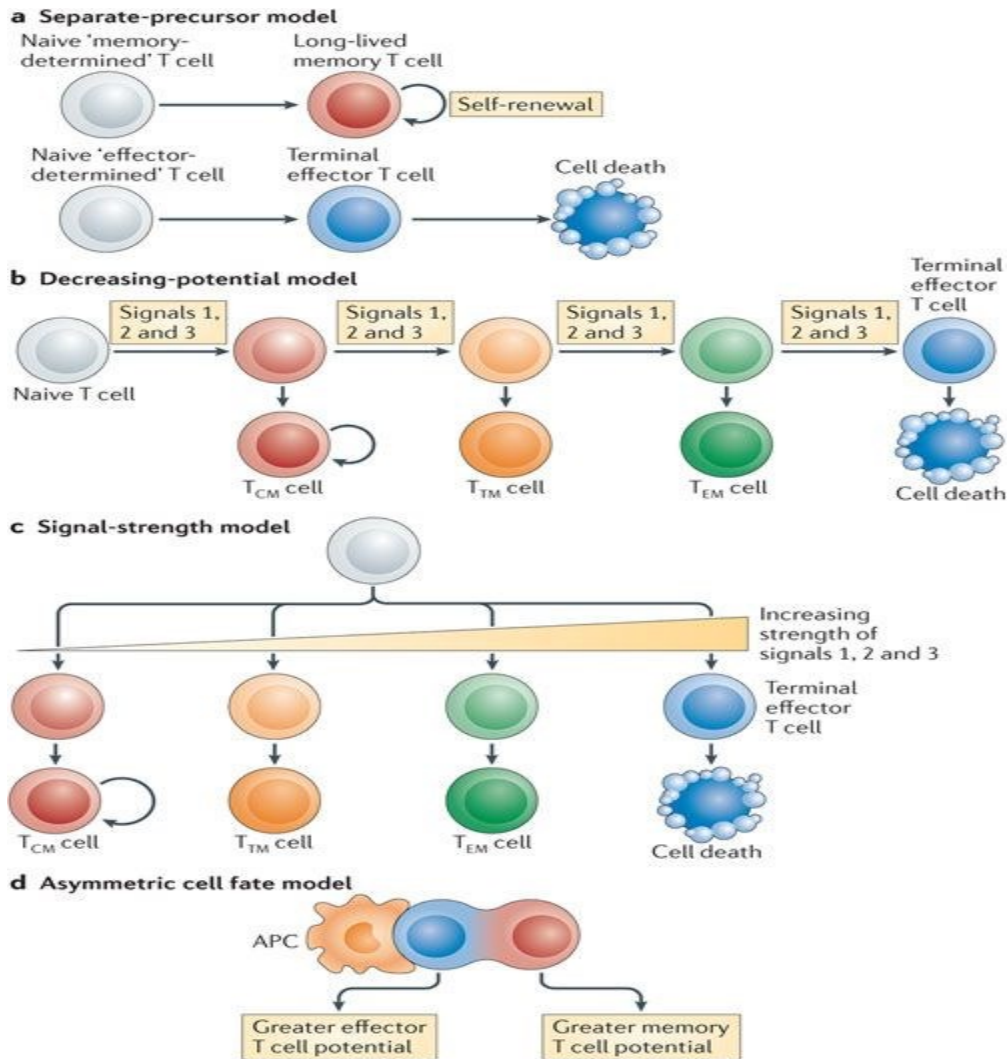
Plusieurs stratégies visant à optimiser la spécificité, l'expansion, la persistance ou encore la migration des LT ont été développées afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique de l'IA. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons à l'aspect de différenciation des LT ainsi qu'à la migration et la rétention des LT tumeur-spécifiques au site de la tumeur. Une meilleure compréhension de ces phénomènes devrait nous permettre d'améliorer l'efficacité des stratégies d'immunothérapie adoptive proposées à l'heure actuelle.

1.4.4.4.1 Le stade de différenciation des LT

Les mécanismes moléculaires permettant à un LT naïf de se différencier en LT mémoire ou effecteur sont encore mal connus. Toutefois, plusieurs modèles ont été proposés afin de tenter de l'expliquer. On cite : le modèle des précurseurs distincts, le modèle du potentiel décroissant, le modèle de la division asymétrique, le modèle de dédifférenciation ainsi que le modèle de la force du signal ou modèle linéaire progressif (206) (Fig.7).

Ce dernier propose qu'à la suite d'une stimulation antigénique, les cellules T subissent des modifications phénotypiques, transcriptionnelles et fonctionnelles progressives. En fonction de la force et de la durée des signaux du TCR, de co-stimulation et des cytokines qu'elles perçoivent lors de l'activation, elles s'engagent dans un processus de prolifération et de différenciation. Afin d'assurer une efficacité anti-tumorale, les cellules T doivent être capables de pleinement se différencier en effecteurs ayant des propriétés cytotoxiques. Cependant, plusieurs études indiquent que dans le contexte de l'IA, la différenciation des cellules T est inversement corrélée à leur efficacité anti-tumorale (207). En effet, le processus de

différenciation des cellules T entraîne une perte de leur capacité proliférative, d'auto-renouveaulement ainsi que leur multipotence, ce qui réduit leur persistance et leur capacité à induire une protection à long terme contre une rechute éventuelle. Dans cette section, nous allons brièvement décrire les différentes populations de LT et leur importance pour l'IA, puis les stratégies envisagées afin d'améliorer la qualité des LT dans le contexte de l'IA.



Nature Reviews | Immunology

Figure 7: Différents modèles pouvant expliquer la génération des LT mémoire et effecteur (adapté de (206))

1.4.4.4.1.1 L'hétérogénéité des LT et son importance pour l'IA

Les cellules T matures constituent une population hétérogène composée de cellules qui se trouvent à différents stades de différenciation et que l'on peut distinguer par de molécules surface qu'elles expriment, leur localisation anatomique et leur fonction. Cette diversité est le

résultat de l'intégration de stimuli antigéniques et environnementaux perçus par les LT lors de l'initiation d'une réponse primaire ou secondaire (208). En effet, lors de l'établissement d'une réponse anti-tumorale primaire, par exemple, les cellules T naïves (Tn) rencontrent des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (APC) qui leur présentent des antigènes tumoraux dans le contexte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. Les signaux provenant du TCR, l'équilibre entre les molécules de co-stimulation et les molécules inhibitrices ainsi que la qualité du milieu inflammatoire, sont intégrés par les cellules T naïves qui entament un programme de prolifération et de différenciation aboutissant à la formation de cellules effectrices T (Teff) et de cellules mémoires (209). Plusieurs modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer le processus de différenciation des LT. Parmi eux, le modèle de différenciation progressive propose qu'en fonction de la force et de la qualité du signal du TCR, de co-stimulation et des cytokines reçu par le LT naïf lors de la phase d'activation, celui-ci peut progressivement se différencier en différentes sous-populations de LT qui se distinguent par des caractéristiques phénotypiques, fonctionnelles et transcriptionnelles distinctes (207). Dans ce modèle le LT naïf (Tn) se différencie progressivement en Tscm (*Stem cell like memory T cells*), puis en Tcm (*Central memory T cells*), et en Tem (*Effector memory T cells*) pour aboutir à la formation de Teff (*Effector T cells*) (Fig.8).

Les cellules Tn sont classiquement définies par la co-expression de l'isoforme RA de la phosphatase transmembranaire CD45, les récepteurs de homing vers les ganglions lymphatiques, la L-sélectine (CD62L) et le récepteur de chémokine CCR7, ainsi que les molécules de co-stimulation CD27 et CD28 (210). Ces caractéristiques phénotypiques facilitent l'entrée des cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires, où elles rentrent en contact avec les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) qui leur présentent l'antigène et

induisent leur activation. Ceci entraîne la différenciation des LT naïfs en progénitures mémoire et effecteurs plus différenciés (211). Les LT activés perdent l'expression du CD45RA et acquièrent l'expression du CD45RO, marqueur d'activation des LT (212). Parmi les LT exprimant le CD45RO, on distingue deux sous-populations majeures de LT mémoire, les LT centraux mémoire (Tcm) et les LT effecteurs mémoire (Tem), définies sur la base de l'expression du CD62L et du CCR7 (213) (Fig.8).

A l'instar des Tn, l'expression du CD62L et du CCR7 est maintenue dans les Tcm, tandis qu'elle est perdue sur les Tem. D'un point de vue fonctionnel, la présence ou l'absence de ces molécules permet aux LT de recirculer entre le sang et les organes lymphoïdes ou les tissus périphériques, respectivement (211, 213). Les molécules de co-stimulation, CD27 et CD28, sont généralement exprimés par la majorité des LT mémoire; toutefois, leur expression peut être perdue à mesure que les cellules se différencient de manière terminale et acquièrent progressivement l'expression de molécules de signalisation inhibitrices, telles que le KLRG1 (*Killer Cell Lectinlike Receptor subfamily G, member 1*) (214), puis transitent vers la sénescence (215). Enfin, les différentes sous-populations de LT activés augmentent leur expression du récepteur, IL-2R β , commun à l'IL-2 et l'IL-15, leur permettant de subir une prolifération homéostatique en réponse à l'IL-15 (216, 217), ainsi que le CD95 (également appelé FAS) (218), qui peut fournir soit un signal de co-stimulation ou un signal pro-apoptotique, en fonction de l'efficacité de la formation du complexe de signalisation du CD95 (219) (Fig.8).

Contrairement aux LTn, les LT mémoire sont capables de libérer rapidement des cytokines suite à une restimulation (220). Bien que les deux sous-populations de LT mémoire

soient capables de produire du TNF α (*Tumour Necrosis Factor- α*), les Tcm secrètent plus efficacement de l'IL-2 tandis que les Tem ont une meilleure capacité à produire de l'interféron- γ (IFN γ) et de molécules cytotoxiques (213). Plus récemment, une nouvelle population de cellules mémoire, les Tscm, a été caractérisée pour la première fois par Emerson et ses collègues dans des modèles de transplantation (221). Chez l'homme, les Tscm ressemblent aux cellules T naïves puisqu'ils expriment l'isoforme RA du CD45 (CD45RA⁺CD45RO⁻), la chaîne α du récepteur de l'IL-7, qui peut faciliter leur survie (73), ainsi que des taux élevés de molécules facilitant leur migration vers les ganglions lymphatiques, tels que la L-sélectine CD62L et le récepteur de chimiokine CC 7 (CCR7). Cependant, les Tscm se distinguent des Tn par la forte expression de la chaîne β du récepteur de l'IL-2 (IL-2R β) (222) et du CD95 (Fas) (223). D'autre part, les Tscm humains expriment des récepteurs de co-stimulation (incluant CD27 et CD28), ce qui peut améliorer leur capacité proliférative (224). De plus, les Tscm ont un programme génétique qui leur permet de proliférer extensivement et ils ont la capacité de se différencier en Tcm et Tem (Fig.8).

Plus récemment, une autre population de lymphocytes T mémoire résidants dans les tissus (Trm), a été identifiée. Ces LT ont pour principale caractéristique d'être confinés dans les tissus non lymphoïdes (225). Elles jouent un rôle essentiel dans la protection des tissus épithéliaux humains contre les maladies infectieuses et inflammatoires. En fonction des organes où elles résident, ces cellules peuvent-elles même être subdivisées en différentes sous-populations. Les Trm se caractérisent par l'expression de la lectine de type C, CD69, et des intégrines (α E(CD103) β 7) et CD49a (VLA-1 ou α 1 β 1), qui permettent leur rétention dans les tissus. En effet, le CD69 empêche la sortie des Trm des tissus en inhibant l'expression de S1PR1 (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*) (226, 227), essentiel à la recirculation des LT

dans le sang et les organes lymphoïdes. Tandis que le CD103 les retient dans les tissus en se liant, notamment à l'E-cadhérine, exprimée dans les tissus épithéliaux. Toutefois, tous les Trm n'expriment pas le CD103; son expression semble être restreinte au Trm présent dans les tissus épithéliaux, tels que l'intestin, la peau et le foie. De même, la présence d'une sous-population de TIL CD103⁺ a été corrélée avec une importante infiltration lymphocytaire intra-épithéliale (228, 229), soutenant l'hypothèse que le CD103 favorise le recrutement des Trm dans les îlots tumoraux épithéliaux. La localisation intra-épithéliale des cellules T CD8⁺CD103⁺ a également été observée dans les cancers colorectaux et de la vessie et a été associée à l'expression de l'E-cadhérine sur les cellules tumorales (22, 230). La présence des Trm dans différents cancers humains suggèrent leur rôle primordial dans la réponse spécifique anti-tumorale (231). L'expression du granzyme B, de la perforine et du marqueur de dégranulation LAMP-1 (CD107a) par des TIL CD8⁺ CD103⁺ renforce l'hypothèse de leur potentiel cytotoxique (228, 230, 232) (Fig.9).

Au niveau transcriptionnel, la différenciation des LT est gouvernée par plusieurs facteurs de transcription qui sont graduellement acquis ou réprimés au cours de la différenciation. Les LT naïfs sont notamment associés à l'expression des transducteurs de signalisation de la voie WNT-β-catenin, TCF7 (*T cell factor 7*) et LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*), qui favorisent l'expression du CD62L et du CCR7 (233); ID3 (*inhibitor of DNA-binding 3*), un important régulateur de la stabilité du génome humain (234); FoxO1 qui favorise la persistance des cellules T mémoire en induisant des gènes favorisant la survie cellulaire (*BCL2, Il7r, Tcf7*) et en maintenant le phénotype T_{cm} (Sell, codant pour CD62L et Ccr7) (235); et KLF-2 (*Kruppel-like factor 2*), qui régule l'expression de S1PR1 et favorise la sortie des cellules vers le sang et les organes lymphoïdes (236). Ces facteurs sont aussi

exprimés dans les Tscm et les Tcm, mais leur expression est progressivement perdue à mesure que les cellules se différencient. A l'inverse, les facteurs de transcriptions, tels que ID2 (*inhibitor of DNA-binding 2*) (237, 238), EOMES (*eomesodermin*) (239, 240), T-BET (TBX21-*T-box 21*) (241), BLIMP1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) et ZEB2 (*zinc finger E-box binding homeobox 2*) (242, 243), qui sont des régulateurs clés de la différenciation et la fonction des LT effecteurs, sont exprimés dans les LT effecteurs et sont acquis progressivement au cours de la différenciation des LT (Fig.8).

Plusieurs études confirment l'idée que les Trm présentent un profil transcriptionnel unique (244, 245). Dans les Trm les facteurs de transcription HOBIT et BLIMP1 sont fortement exprimés et coopèrent pour inhiber la transcription des gènes qui favorisent la sortie des LT des tissus (ie. *Klf2*, *Tcf7*) (246). Le facteur de transcription Runx3 est lui aussi primordial au développement et à l'acquisition des fonctions effectrices des Trm (247, 248). Runx3 peut agir en amont de Hobit et Blimp-1 dans les Trm, en induisant l'expression de Blimp-1 et en améliorant l'accessibilité aux motifs partagés par ces deux facteurs (249). NOTCH semble également important à la génération et au maintien des Trm, par l'induction de l'expression du CD103 et par la régulation de leur métabolisme (250). L'expression de AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) (251) et le récepteur nucléaire NR4A1 semblent également essentiels au développement et à la persistance des Trm (252). Cependant, l'inhibition de KLF2 (*Krüppel-like factor 2*), qui régule l'expression de S1PR1 et favorise la sortie des cellules vers le sang et les organes lymphoïdes (236), est essentielle à la différenciation des Trm (253). De même, l'expression du facteur de transcription EOMES est inhibée dans les Trm et sa surexpression bloque la génération de Trm (254). Dans les Trm, l'expression de Tbet est considérablement réduite par TGF- β et Runx3, ce qui permet de l'empêcher d'interférer

avec la signalisation TGF- β pour induire les Trm, mais reste suffisante pour induire l'expression du récepteur de l'IL-15 (CD122) qui permet d'assurer la survie homéostatique des Trm (248) (Fig.9).

Plusieurs évidences soutiennent l'hypothèse que le stade de différenciation des lymphocytes T est inversement proportionnel à leur capacité de prolifération et de persistance *in vivo* (255). Dans le cadre de l'IA contre le cancer, il a été démontré que les cellules T naïves avaient une meilleure efficacité thérapeutique que les cellules T mémoire (256-258). Dans le compartiment mémoire, les Tscm présentent une meilleure activité anti-tumorale par rapport aux Tcm et aux Tem, ce qui suggère que leur utilisation en IA amènera une meilleure efficacité thérapeutique (222, 223, 259, 260). A leur tour, les Tcm présentent une activité anti-tumorale accrue par rapport aux Tem, et cela a été décrit aussi bien chez la souris (261, 262), que chez des primates non humains (263) ainsi que dans des modèles de souris humanisées (264).

Au fur et à mesure que les cellules T se différencient, elles perdent progressivement les caractéristiques associées aux cellules souches, telles que leur potentiel de prolifération et d'auto-renouvellement, leur capacité de survie et leur multipotence. Ces changements fonctionnels ont pour résultat une perte d'efficacité thérapeutique de ces cellules à long terme après leur transfert adoptif chez le patient. Le transfert adoptif de LT peu différenciés, idéalement des Tscm ou des Tcm, serait souhaitable afin d'induire une réponse anti-tumorale efficace et durable à long terme. Ainsi, on devrait déterminer préalablement le type de cellules à injecter aux patients en tenant compte de leur phénotype, la longueur de leurs télomères, leur capacité à produire de l'IL-2 ainsi que de leur spécificité antigénique. Il serait donc intéressant

d'envisager le développement de stratégies permettant de ralentir ou d'inverser la différenciation des LT dans le contexte de l'IA anticancéreuse.

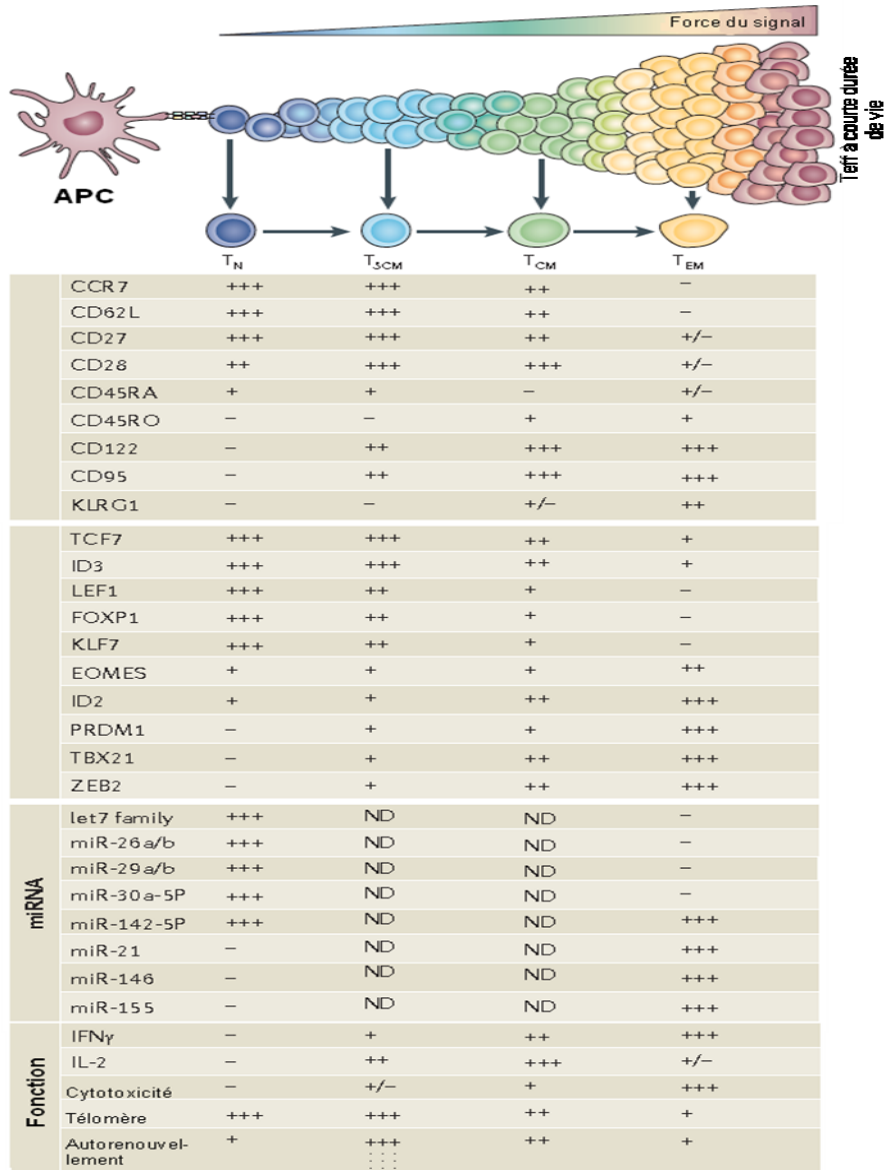


Figure 8: Modèle de différenciation progressive des lymphocytes T (adapté de (207))

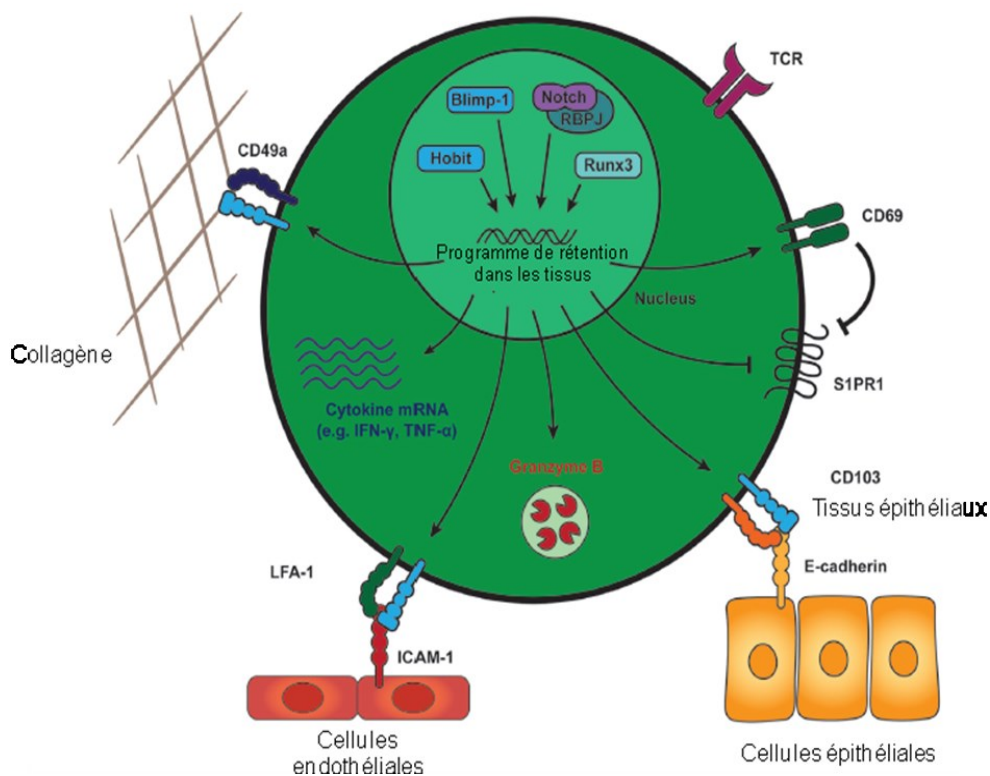


Figure 9: Caractéristiques générales des lymphocytes CD8⁺ résidants mémoires (adaptée de (244))

4.4.4.1.2 Moduler la différenciation des LT pour améliorer l'efficacité de l'IA

Tel que mentionné plus haut, il semblerait que le stade de différenciation du LT influence significativement son efficacité thérapeutique *in vivo*. Avant que cela ne soit pleinement compris, les protocoles qui étaient utilisés pour générer des LT pour l'IA reposaient souvent sur l'utilisation de puissants stimuli activateurs, notamment des anticorps monoclonaux anti-CD3, de fortes concentrations d'IL-2 et des cellules nourricières allogéniques, qui permettaient la génération d'un grand nombre de LT réactifs aux tumeurs, mais qui entraînaient inexorablement leur différenciation terminale et leur sénescence. Afin de limiter l'effet délétère de l'expansion *ex-vivo* des LT sur leur différenciation, de nouvelles

stratégies de culture ont été explorées, notamment l'utilisation de cytokines γ C autres que l'IL-2 ainsi que de petites molécules ciblant des voies métaboliques et développementales clés (207).

Plusieurs études ont montré que la stimulation des LT avec les cytokines de la famille γ C, IL-15, IL-7 et IL-21, favorise la prolifération des LT sans induire leur différenciation terminale. En effet, la culture de LT en présence d'IL-15 entraîne la génération de LT ayant des propriétés phénotypiques, fonctionnelles, métaboliques et transcriptionnelles similaires à celles des Tcm naturels (256, 262, 265-267). Par conséquent, les cellules T spécifiques des tumeurs générées en présence d'IL-15 induisent des réponses anti-tumorales plus efficaces par rapport à celles générées en présence d'IL-2 (262). D'autre part, la combinaison de l'IL-15 et de l'IL-7 permet de favoriser la génération et l'expansion des Tscm, tout en préservant leurs caractéristiques mémoires (268). Plus récemment, plusieurs groupes ont évalué l'effet de l'IL-21 sur l'expansion et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des tumeurs (269-272). L'IL-21 inhibe profondément la différenciation des cellules T, permettant ainsi la génération de Tscm. Chez la souris, l'IL-21, contrairement à l'IL-2, a entraîné une inhibition dose-dépendante de l'expression du marqueur d'activation, CD44, ainsi que la capacité lytique des LT, tout en préservant l'expression des facteurs de transcription Tcf7 et Lef1, associés à la différenciation mémoire des LT, et du CD62L, ainsi que la capacité des LT à produire de l'IL-2 (270). De plus, ces cellules présentaient une activité anti-tumorale accrue comparées aux cellules cultivées dans de l'IL-2. De même, l'expansion de LT humains CD45RA⁺ spécifiques à la tumeur en présence d'IL-21 favorise le maintien de l'expression du CD45RA, CD62L, CD28, CD27 et IL-7R α par les LT et préserve leur capacité à produire de l'IL-2 (269, 271) (Fig. 10).

D'autre part, plusieurs évidences indiquent que la prolifération et la différenciation des LT sont régulés par des voies métaboliques et développementales conservées au cours de l'évolution, telle que la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) et la voie WNT/ β -caténine (273). La modulation de ces voies par de petites molécules pharmacologiques, déjà approuvées en clinique à d'autres fins thérapeutiques, constitue une stratégie attrayante pour moduler la différenciation des LT et améliorer leurs propriétés thérapeutiques (207). Par exemple, la Rapamycine, un inhibiteur de mTOR, actuellement utilisé en clinique pour faciliter la greffe d'organes solides et de cellules souches hématopoïétiques, améliore non seulement la formation des LT CD8⁺ mémoire, mais augmente également leurs fonctions anti-tumorales (274). De même, la Metformine, un agoniste de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) utilisé pour traiter le diabète de type 2, améliore la survie et la réponse anti-tumorale des LT *in-vivo* (274). Enfin, les inhibiteurs de la GSK3 β (Glycogènesynthase 3 β), en cours d'évaluation clinique pour la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives (275), peuvent être utilisés pour activer la voie de signalisation WNT- β -caténine dans les cellules T pour générer des cellules Tscm multipotentes avec un potentiel d'auto-renouvellement (222, 223). Bien que ces réactifs restreignent efficacement la différenciation des cellules T et potentialisent leurs fonctions anti-tumorales *in-vivo*, ils inhibent également leur prolifération, ce qui n'est pas souhaitable pour l'IA. Pour cette raison, l'identification de nouvelles molécules capables de découpler les processus d'expansion et de différenciation cellulaires est souhaitable en IA. Récemment, plusieurs études ont démontré que l'inhibition pharmacologique des isoformes de l'AKT, AKT1 et AKT2, aussi bien durant l'expansion de TIL, que la génération de LT spécifiques à des antigènes mineurs, que pour l'expansion des CAR-T, favorise l'expression de propriétés phénotypiques et migratoires analogues à celles

des Tcm, sans altérer le rendement cellulaire global (276-281). Ainsi, les inhibiteurs de l'AKT pourraient permettre la génération d'un grand nombre de cellules T réactives à la tumeur, différenciées de façon minimale à des fins thérapeutiques. Un premier essai clinique de thérapie génique humaine incorporant des inhibiteurs d'AKT dans le processus de fabrication des lymphocytes T, est actuellement en cours (278). Une autre étude récente a révélé que l'inhibition synergique des voies PI3K δ (phosphatidylinositol 3-kinase δ) et VIP (*vasoactive intestinal peptide*) favorise l'expansion, la persistance et la réponse anticancéreuse *in-vivo* de lymphocytes T isolés à partir de patients atteints de lymphome ainsi que de CAR-T (282).

Une autre stratégie envisagée pour favoriser un phénotype mémoire des LT utilisés en IA consiste à reprogrammer la différenciation des LT différenciés de façon terminale.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la stimulation antigénique chronique des LT infiltrant la tumeur (TIL) peut conduire à leur différenciation terminale et à leur épuisement fonctionnel (283-285). Bien que les TIL puissent être réactivés et amplifiés *in-vitro* en présence de cytokines immunostimulantes et malgré les succès thérapeutiques obtenus par leur utilisation en IA, ces cellules restent dans certains cas incapables de médier des réponses complètes et durables (286). L'élaboration de nouvelles stratégies pour dédifférencier des TILs épuisés en cellules moins différenciées permettraient d'améliorer leur efficacité thérapeutique.

Plusieurs études ont montré qu'il était possible de dédifférencier des cellules matures en cellules souches pluripotentes induites (iPSC- *induced Pluripotent Stem cells*) grâce à l'expression ectopique de facteurs de transcriptions ou de microRNA clés pour les cellules souches (287-289), ouvrant ainsi la voie à la possibilité de reprogrammer des LT différenciés

de façon terminale en LT moins différenciés et plus efficaces pour l'IA. Depuis, plusieurs équipes ont montré la faisabilité de produire des iPSC à partir de LT en forçant l'expression des facteurs de transcription, OCT4, SOX2, KLF4 et MYC (290-292). Ces études ont également montré que les iPS obtenus à partir de la dédifférenciation des LT conservaient les régions VDJ du TCR, suggérant que des TILs dédifférenciés par la même méthode pourraient conserver leur spécificité anti-tumorale. Par la suite, la compréhension des mécanismes qui gouvernent la différenciation des LT durant la thymopoïèse ont permis de mettre au point des protocoles *ex-vivo* qui permettent de générer des LT à partir des iPSC, des cellules souches embryonnaires ou des cellules souches hématopoïétiques, notamment *via* l'induction de la voie Notch, essentielle au développement intrathymique des LT (293-297). Il a été démontré que des TILs isolés à partir d'un patient atteint d'un mélanome métastatique pouvaient être reprogrammés en iPSC, puis redifférenciés en LT CD8⁺ capables de produire de l'IFN- γ suite à une restimulation avec l'antigène apparenté MART-1 (*Melanoma-associated antigen recognized by T cells*) (296). Toutefois, l'intégrité fonctionnelle *in-vivo* de ces cellules n'a pas été testée. Une étude récente a indiqué que des cellules T reprogrammées en iPS acquéraient le phénotype et les caractéristiques fonctionnelles des cellules innées, T $\gamma\delta$. Lorsque ces dernières ont été génétiquement modifiées pour exprimer un CAR spécifique du CD19, elles ont pu médier une importante régression tumorale dans un modèle tumoral de xéno greffe de lymphome humain (298). Bien que ces approches soient attrayantes, leur efficacité reste limitée du fait de la faible efficacité de la reprogrammation et de la durée nécessaire pour réaliser une reprogrammation complète, sans oublier l'apparition d'anomalies génétiques et épigénétiques dans les iPSC modifiées. La mise au point de protocoles plus sécuritaires, moins longs et plus directes est nécessaire afin qu'ils puissent être appliqués en IA.

D'autre part, les mécanismes épigénétiques, incluant la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'accessibilité de la chromatine, jouent un rôle critique lors de la différenciation des cellules T (299). La compréhension de ces mécanismes pourrait être bénéfique à l'IA. Plusieurs études ont récemment montré qu'une inhibition épigénétique des gènes associés à la mémoire s'opérait lors de l'activation des LT afin de permettre leur différenciation en LT effecteurs et leur bon fonctionnement (300-303). Ces études ont révélé l'implication de l'ADN méthyltransférase 3A (DNMT3A) (303), une enzyme responsable de la méthylation de novo de l'ADN, et des histones méthyletransférases, EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*) (301) et SUV39H1 (304), qui participent à la méthylation des histones, ce qui entraîne la répression transcriptionnelle des gènes. Chez la souris, l'inhibition conditionnelle de Dnmt3a (303), Ezh2 (301) et Suv39h1 (304) dans les lymphocytes T entraîne une réduction du nombre de LT effecteurs et une augmentation de la population T mémoire après une infection virale. De ce fait, une reprogrammation épigénétique des LT différenciés de façon terminale, par le biais d'inhibiteurs de ces enzymes, pourrait être envisagée afin de leur permettre de réacquérir des propriétés mémoire et améliorer ainsi leur efficacité thérapeutique.

Enfin, au cours de la dernière décennie, les micros ARN (miARN) ont émergé comme des régulateurs clés de la fonction et de la différenciation des LT (305, 306). Plusieurs études ont associé l'expression d'un seul miARN à la régulation de la différenciation mémoire des LT CD8⁺. Par exemple, l'expression de miR-143 (307), miR-155 (308, 309) ou miR-28 (310) favorise la différenciation mémoire des LT et améliore leur réponse anti-tumorale. A l'inverse, c'est l'inhibition du cluster miR-17-92 (311, 312) ou de miR-23a (313, 314) qui favorise la différenciation mémoire des LT et améliore leur fonctionnalité *in-vivo*. Ces données suggèrent que les micros ARN (leur surexpression ou leur inhibition) constituent des cibles

potentiellement intéressantes pour moduler la différenciation des LT dans le contexte de l'IA. Leur petite taille pourrait permettre de faciliter leur intégration dans des CARs ou dans des TCR transgéniques, par exemple.

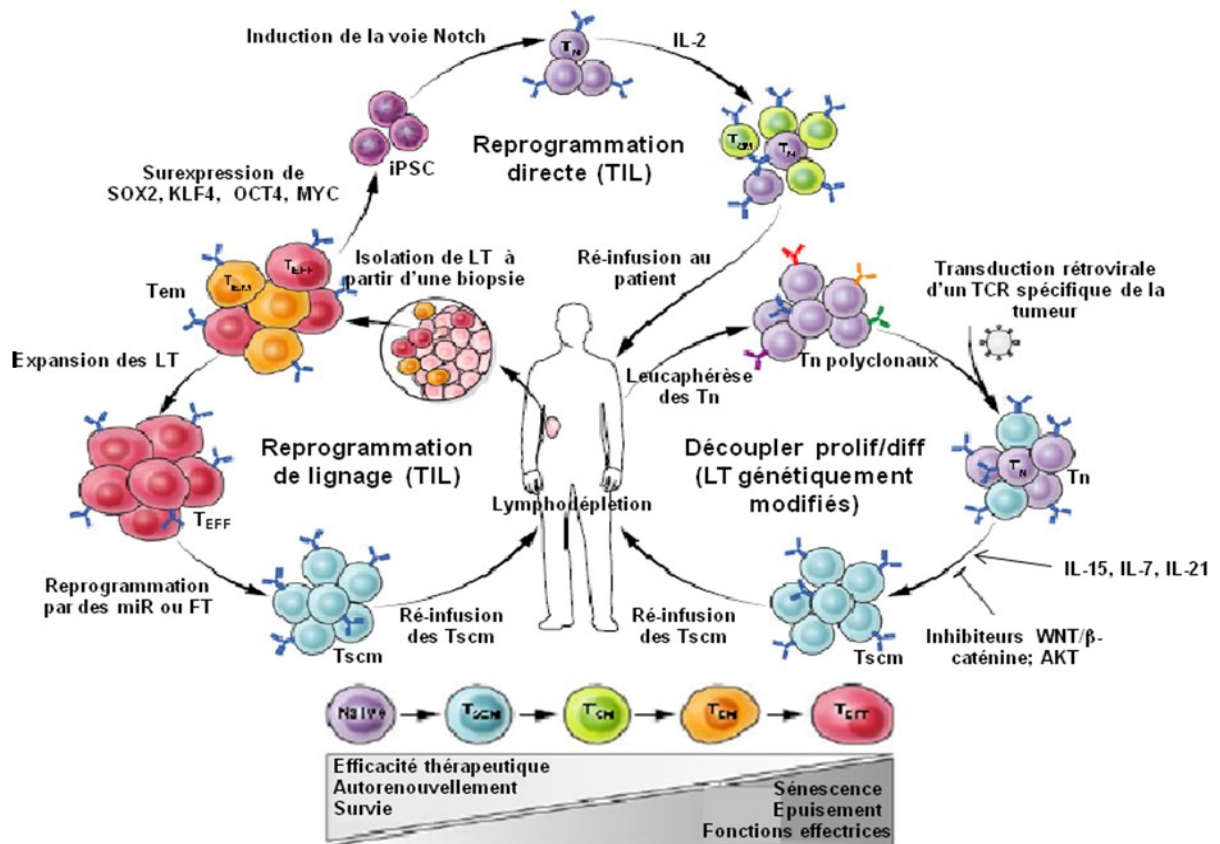


Figure 10: Différentes approches permettant d'obtenir des LT CD8⁺ spécifiques de la tumeur minimalement différenciés (adaptée de (273))

4.4.4. 2 La migration et la rétention des LT transférés vers le site de la tumeur

Afin que les LT transférés dans le cadre de l'IA puissent efficacement éliminer la tumeur, il faut qu'ils puissent migrer vers le site de la tumeur, qu'ils l'infiltrant et qu'ils puissent être retenus dans le microenvironnement tumoral. Dans cette section, nous allons brièvement

décrire les événements clés du processus de migration des LT activés, puis les différentes stratégies envisagées pour améliorer l'efficacité de migration des LT transférés dans le cadre de l'IA.

4.4.4. 2.1 Evénements clés du processus de migration des LT

Les cellules T constituent un élément clé de la réponse immunitaire. Elles ont la capacité de migrer à travers différents tissus à la recherche de leur antigène-CMH apparenté. La migration des LT implique des interactions complexes entre les cellules T et les cellules endothéliales (CE). Ce processus nécessite une fixation initiale transitoire à l'endothélium, suivie d'un roulement, d'une adhésion ferme et d'une activation des lymphocytes T sur la surface endothéliale et enfin d'une extravasation à travers la paroi du vaisseau sanguin jusqu'au site de l'infection ou de la tumeur (273). Ce processus complexe nécessite l'implication de plusieurs familles de molécules, notamment, les récepteurs de chimiokines, les sélectines et les intégrines. Lorsque les LT naïfs sont activés, ils subissent des changements fonciers dans l'expression des protéines de surface et de récepteurs spécifiques de l'inflammation. Les LT effecteurs perdent l'expression du CD62L et du CCR7, perdant ainsi leur capacité à accéder aux ganglions lymphatiques par les veinules endothéliales hautes. A la place, les LT activés acquièrent l'expression d'un groupe de molécules qui leur permettent de migrer vers les tissus enflammés ou malins. Ceci inclut les ligands des E et P sélectines, qui permettent le roulement des cellules T sur l'endothélium, et les récepteurs de chimiokines, tels que CXCR3, qui se lie aux chimiokines inflammatoires CXCL9 et CXCL10 sécrétées par les tissus infectés ou malins. La liaison des récepteurs de chimiokines provoque l'activation de l'intégrine LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) ainsi que d'autres intégrines nouvellement

exprimées, telles que VLA-4 (*very late antigen 4*), qui se lie à ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule*) et VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) exprimés sur les tissus infectés ou malins, ce qui permet leur adhésion. L'expression subséquente de chimiokines par le tissu malade facilite l'extravasation des lymphocytes T dans le tissu. Une fois dans le tissu, les LT peuvent être exposés à certains facteurs spécifiquement exprimés dans le tissu induisant l'expression d'un phénotype spécifique par les LT. Par exemple, le TGF β produit dans l'épithélium de l'intestin grêle induit l'expression de l'intégrine $\alpha E\beta 7$ (CD103) qui, en se liant à l'E-cadhérine exprimée par l'épithélium, permet le maintien local des lymphocytes T (315, 316), afin d'exercer leurs fonctions au contact de l'antigène, entraînant ainsi une résolution de la menace ou de la maladie (317-319).

4.4.4. 2.2 *Améliorer la migration des LT dans le contexte de l'IA*

Une migration efficace des LT transférés, dans le cadre de l'IA, vers le site de la tumeur, est une étape importante pour le succès de cette thérapie. En effet, il a été démontré, après le transfert adoptif de LT préalablement marqués, qu'il existe une corrélation positive entre le nombre de LT transférés infiltrant le microenvironnement tumoral et une réponse clinique (320). Mais surtout, que l'efficacité de migration des LT transférés était très faible (321, 322). C'est pourquoi, l'élaboration de stratégies permettant d'améliorer la migration des LT transférés vers le site de la tumeur pourrait aider à optimiser l'efficacité de l'IA. La compréhension des mécanismes majeurs qui gouvernent la migration des leucocytes vers les tissus infectés ou malins a permis aux scientifiques de tester différentes stratégies pour améliorer leur migration dans des modèles précliniques d'IA.

La faible infiltration des LT transférés dans la tumeur malgré la détection de ces derniers dans le sang périphérique des patients traités suggère l'existence de mécanismes intrinsèques de résistance au niveau du microenvironnement tumoral. Parmi ces facteurs, des études récentes indiquent que certaines tumeurs n'expriment pas les chimiokines nécessaires au recrutement des LT activés (196, 319), ce qui entrave le rejet de la tumeur par ces cellules *in vivo*. Pour pallier à cet inconvénient, plusieurs équipes ont tenté de rediriger la migration des LT en induisant l'expression de récepteurs de chimiokines en fonction des chimiokines correspondantes exprimées par les tumeurs étudiées. A cet effet, Kershaw et ses collaborateurs ont montré, pour la première fois, qu'il était possible d'améliorer l'activation et la migration *in vitro* des LT en les modifiant génétiquement pour exprimer le récepteur de chimiokines CXCR2 (récepteur du CXCL1 exprimé par certaines tumeurs, tel que le mélanome) (323). Plus tard, une autre équipe a montré que des LT CD8⁺ humains génétiquement modifiés pour exprimer le récepteur de chimiokines, CCR2, avaient une meilleure capacité à migrer en réponse au CCL2, ligand de CCR2, dérivés des gliomes (324). De même, Di Stasi et al., ont démontré que l'induction de l'expression du récepteur de chimiokines CCR4 sur des CAR-T ciblant le CD30 a permis d'améliorer leur migration dans un modèle de lymphome Hodgkinien exprimant le CD30 et le CCL17, ligand du CCR4. De plus, le transfert adoptif de ces LT CCR4-CAR-CD30 a induit une meilleure réponse anti-tumorale dans un modèle de xénogreffe grâce à une migration plus efficace de ces CAR-T vers le site de la tumeur (325). Dans une étude plus récente, Rapp et ses collaborateurs ont montré que la transduction de LT cytotoxiques (CTL) pour exprimer le CCR4, a permis d'améliorer leur migration vers le site de la tumeur après leur TA dans un modèle de cancer pancréatique et a permis d'éradiquer la tumeur chez 40% des souris traitées (326). Deux autres études indépendantes ont montré que

l'induction de l'expression du CCR2b sur des CAR-T (spécifiques soit pour la mésothéline ou GD2 (327)) a permis d'améliorer significativement la migration de ces cellules vers le site de la tumeur, ce qui a entraîné une meilleure réponse anti-tumorale. Un autre candidat intéressant pour améliorer l'efficacité de l'IA est le récepteur de chémokines CXCR3. En effet, une étude intéressante a montré que le transfert adoptif de CAR-T dirigé contre NKG2D a permis de recruter et d'activer des LT CD4⁺ et CD8⁺ endogènes spécifiques au site de la tumeur de façon dépendante du CXCR3 pour éradiquer efficacement un cancer ovarien (328). D'autres thérapies anticancéreuses, telles que le blocage de PD-1 (329) ou la chimiothérapie (330), semblent favoriser le recrutement des LT transférés vers le site de la tumeur *via* l'induction de l'expression des ligands de CXCR3 au site de la tumeur.

D'autre part, des études ont montré que dans un contexte tumoral, les vaisseaux sanguins sont dépourvus de péricytes, dilatés, irréguliers et désorganisés, ce qui contribue à une augmentation de la pression interstitielle, au dysfonctionnement de la barrière endothéliale et à une perméabilité accrue de cette dernière (331). Cette perte d'intégrité de l'endothélium vasculaire dans les tumeurs limite l'infiltration des LT spécifiques des tumeurs, qu'ils soient endogènes ou adoptivement transférés et de ce fait, la possibilité d'atteindre leur cible pour l'éliminer (332). On sait aussi que les tumeurs produisent différents facteurs pro-angiogéniques dans le microenvironnement tumoral, tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factors*) et le FGFs (Fibroblast Growth Factors), qui réduisent l'expression des molécules d'adhésion, ICAM-1/2 (*ICAM-Intracellular Adhesion Molecule*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) et le CD34 sur les cellules endothéliales (333), limitant ainsi l'infiltration des LT dans les tumeurs. Différentes stratégies ont été envisagées afin de permettre aux différents traitements d'immunothérapie et aux LT de passer à travers la barrière

endothéliale de la tumeur (334). Ces stratégies sont essentiellement basées sur l'utilisation d'inhibiteurs angiogéniques (335) et des agents bloquant le VEGF (336, 337), qui permettent de rétablir transitoirement l'intégrité de la barrière endothéliale, notamment en empêchant la réduction de l'expression des molécules d'adhésion permettant ainsi l'infiltration des LT dans la tumeur. Dans la même ligne, des CAR-T transduits avec le récepteur de type 2 du VEGF ont démontré une meilleure infiltration au site de la tumeur et une meilleure réponse anti-tumorale (338).

L'ensemble de ces études montre qu'il est possible d'améliorer la migration des LT transférés dans le contexte d'une IA vers le site de la tumeur, en sélectionnant, par exemple, soigneusement le récepteur de chimiokines à exprimer en fonction du profil de sécrétion de la tumeur à traiter. Bien que ces études chez la souris semblent prometteuses, il sera nécessaire de confirmer leur efficacité chez l'humain et d'envisager éventuellement des thérapies de combinaison (avec la chimiothérapie ou l'inhibition de l'interaction PD-1/PDL1) pour améliorer l'efficacité et la migration des LT transférés aux patients cancéreux.

2. Le rôle du TGF- β dans la biologie du LT et son implication en immunothérapie

La superfamille du TGF β (*Transforming Growth Factor - β*) humain comprend plus de 33 protéines distinctes mais structurellement similaires, conservées au cours de l'évolution. Les membres de cette famille comprennent: les TGF β , les activines, les facteurs de croissance et de différenciation et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP)(339).

Chez les mammifères, la famille du TGF- β a fait l'objet de nombreuses études et est connue pour impacter divers processus cellulaires, tels que la différenciation, la prolifération, la migration, le remodelage de la matrice extracellulaire et l'apoptose, ce qui peut affecter plusieurs processus biologiques, notamment l'embryogenèse, la carcinogenèse, la fibrose, la cicatrisation des plaies et la réponse immunitaire (340). Chez les mammifères, trois isoformes de TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, ont été identifiées. Ces trois isoformes ont des fonctions biologiques similaires, mais sont exprimées dans différents tissus (341). Parmi ces trois isoformes, c'est le TGF- β 1 qui est principalement exprimé dans le système immunitaire.

Dans ce chapitre nous allons nous limiter à décrire le rôle du TGF- β dans la régulation du système immunitaire, plus particulièrement dans le compartiment des cellules T, ainsi que son rôle dans la progression tumorale et son implication pour l'immunothérapie adoptive.

2.1 Expression, activation et signalisation du TGF- β

Le TGF- β est ubiquitaire et est notamment produit abondamment par les cellules du système immunitaire. Contrairement à la plupart des cytokines, le TGF- β est synthétisé sous la forme d'une molécule précurseur inactive contenant un pro-peptide inhibiteur associé à la forme active du TGF- β . Les nombreuses modifications protéolytiques dans l'appareil de golgi résultent en la formation d'un hétérodimère contenant un TGF- β actif en association avec une protéine de latence, LAP (*Latency-associated peptide*). Ce petit complexe latent est soit sécrété, soit associé à une autre protéine, la protéine de liaison au TGF latent (LTBP- *Latent TGF binding protein*), qui redirige le TGF vers la matrice extracellulaire pour une activation ultérieure (342). L'activation du TGF- β nécessite sa libération de ces protéines par le biais de plusieurs mécanismes, notamment la dissociation par le pH acide, l'interaction avec des intégrines ou la protéolyse du LAP par les métalloprotéinases matricielles, lui permettant ainsi d'exercer sa fonction en se liant à son récepteur (343-347). L'activation du TGF- β latent est une étape importante dans le contrôle de sa signalisation. Dans le système immunitaire, les intégrines, notamment $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ et $\alpha\text{v}\beta\text{8}$, jouent un rôle crucial dans l'activation du TGF- β et sont essentielles à la régulation de l'homéostasie immunitaire (348).

Lorsque le TGF- β actif est libéré, il se lie au récepteur de type II du TGF- β (TGF- β RII), une serine/threonine kinase, qui peut recruter et phosphoryler le récepteur de type I du TGF- β (TGF- β RI) pour former un complexe tetramérique. La transduction du signal intracellulaire suite à la formation de ce complexe est médiée par la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription connus sous le nom de Smads, ainsi que par des voies indépendantes de Smad impliquant des cascades de kinases, notamment la voie des MAPKs

(*mitogen-activating protein kinases*), les voies Rho-like GTPase, et les voies phosphatidylinositol-3-kinase/AKT, pour réguler différentes fonctions dans des contextes cellulaires et tissulaires variés. La voie dépendante de Smad est activée lorsque le récepteur TGF- β RI phosphoryle Smad2 et Smad3, qui transloquent dans le noyau pour former un complexe avec Smad4 ou TIF1 (*Transcriptional intermediary factor 1 gamma*) (349, 350). Dans le noyau, le complexe Smad2/3–Smad4 phosphorylé se lie à une séquence d'ADN spécifique appelée éléments de liaison à Smad (SBE- *Smad binding elements*), régulant ensuite la transcription des gènes cibles de TGF- β (351). Les régulateurs négatifs de cette voie incluent Smad7, qui rentre en compétition avec Smad2 et Smad3 pour la liaison du récepteur TGF- β RI et le dégrade *via* le recrutement du complexe *Smurf-containing E3 ubiquitin-ligase*. Les voies indépendantes de Smad activées après la liaison du TGF- β à son récepteur sont mal comprises et leur pertinence pour la régulation des cellules immunitaires est encore mal connue (352).

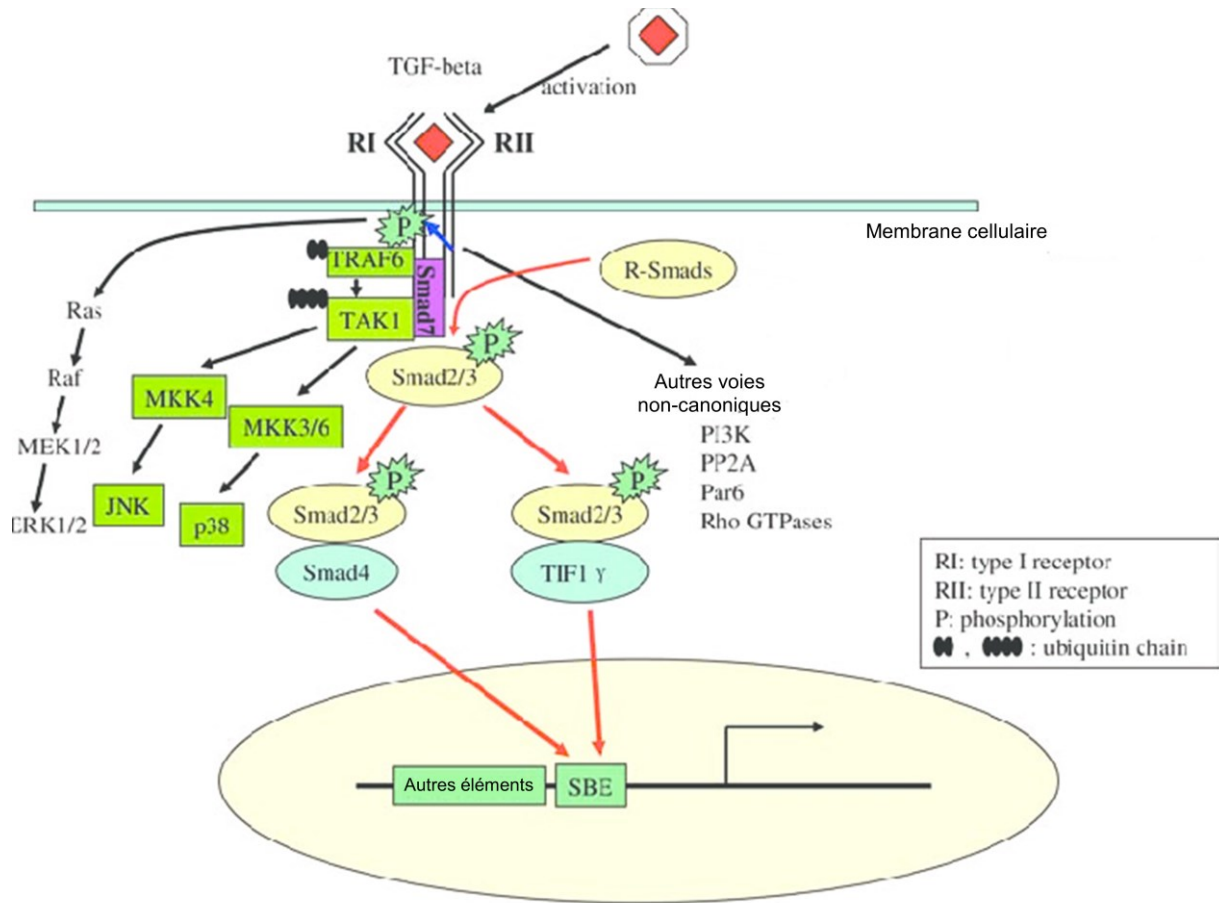


Figure 11: Représentation schématique des voies de signalisation canoniques et non-canoniques du TGF- β (adaptée de (353))

2.2 Rôle du TGF- β dans la régulation du système immunitaire

Le TGF est impliqué dans la régulation de diverses réponses immunitaires, notamment lors des infections, dans l'inhibition des troubles auto-immuns et le cancer, en exerçant un effet régulateur direct sur différents types de cellules immunitaires, telles que les lymphocytes, les cellules NK, les cellules dendritiques et de nombreux sous-types myéloïdes (354, 355).

Les effets du TGF- β sur le système immunitaire ont été révélés pour la première fois en 1986 (356). Établies au début des années 1990, les souris transgéniques déficientes pour le TGF- β 1 (TGF β 1-KO) ont permis de démontrer le rôle central de cette cytokine dans l'inhibition de l'inflammation et le maintien de la tolérance immunitaire (357, 358). En effet, ces souris développent une réponse inflammatoire multifocale sévère et fatale au bout de 3 semaines, associée à la perturbation de différents compartiments immunitaires, notamment les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules dendritiques (357, 359, 360). L'identification ultérieure des récepteurs du TGF- β (TGF- β R) et des facteurs de transcriptions Smad a participé à la révélation des mécanismes moléculaires à la base de la régulation de la réponse immunitaire par TGF- β (353, 361). À la fin du XXe siècle, des modèles murins présentant une inhibition spécifique de la signalisation du TGF- β dans un sous-type cellulaire en particulier ont permis de mieux comprendre le réseau de régulation de la voie du TGF- β *in vivo* (362-365). Par exemple, la surexpression spécifique d'un TGF β RII dominant-négatif (dnTGF β RII) dans les cellules T (366), induit un trouble inflammatoire létal similaire à celui observé dans les souris TGF β 1-KO. Cependant ce phénomène est atténué dans les souris déficientes en cellules T (367). Ces études ont démontré que le rôle essentiel du TGF- β dans le maintien de tolérance dépendait des cellules T et que de multiples mécanismes étaient en jeu. En effet, dans ces souris, les LT conventionnels subissent une prolifération, une activation et une différenciation effectrices non contrôlées, tandis que la proportion des LT régulateurs (Treg), essentiels à la tolérance périphérique (368), est réduite. Ces études ont permis d'établir que le TGF- β était à la fois un régulateur de la physiologie et de la différenciation des lymphocytes T.

Durant la phase de développement intrathymique des LT, le TGF- β joue un rôle de facteur de pro-survie sur les LT CD4⁺ et CD8⁺ ayant une faible avidité pour les antigènes du soi, en favorisant l'expression du récepteur α de l'IL-7 (IL-7R α) (369). Le TGF- β favorise également l'ontogénie des lymphocytes T régulateurs thymiques (tTregs) (369, 370) ainsi que celle de différentes populations de LT innées, telles que les iNKT (invariant natural killer T cells) et les IEL (CD8 α ⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ intra-epithelial lymphocytes) (371).

En périphérie, les LT CD4⁺ matures naïfs continuent à bénéficier du signal de pro-survie du TGF- β , ce qui contribue au maintien de la diversité du répertoire des LT (372).

Dans les LT matures activés, le TGF- β est surtout connu pour ses effets inhibiteurs sur la prolifération, l'activation et les fonctions effectrices des LT. TGF- β inhibe la prolifération des LT activés en inhibant, notamment la production de l'IL-2 ainsi que l'expression de son récepteur par les LT (356). Le TGF- β limite la production de l'IL-2 par les LT activés *via* l'inhibition directe de son promoteur de façon dépendante de Smad3 (373, 374). La voie TGF- β -Smad3 a également été impliquée dans l'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ *via* l'atténuation du signal de co-stimulation du CD28 (375). L'inhibition de la prolifération des cellules T par le TGF- β peut également s'opérer par la régulation de la transcription des gènes cibles du cycle cellulaire, tels que les inhibiteurs des kinases dépendantes de la cycline (p15, p21 et p27, et c-myc) (376, 377). De plus, le TGF- β empêche l'activation des LT en interférant avec les événements de la signalisation proximale du TCR, tels que la phosphorylation et l'activation de la kinase Tec Itk, la mobilisation du Ca²⁺, la translocation de NFATc et l'activation de la protéine kinase Tec ERK kinase, essentiels à la différenciation des LT (378,

379). Le TGF inhibe également la signalisation médiée par le TCR en régulant positivement les tyrosines phosphatases, telles que SHP-1, qui à leur tour régulent négativement les molécules en aval du TCR (380). Le TGF- β s'est également révélé être un puissant suppresseur des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) par le biais de divers mécanismes, notamment l'inhibition de la perforine, des granzymes B et A, de l'interféron gamma (IFN- γ) et du ligand FAS (FASL) (381). D'autre part, le TGF- β inhibe directement l'expression de facteurs de transcription clés dans la régulation de l'activation et de la différenciation des CTL, T-BET (382), EOMES (383) et BLIMP1 (313).

Afin d'assurer une réponse immunitaire efficace, les cellules T doivent se différencier en sous-types spécialisés. Mieux décrite pour les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (384), leur différenciation est fortement influencée par le TGF- β . En effet, Il a été démontré que le TGF- β atténue considérablement la différenciation et la fonction des effecteurs Th1, en inhibant l'expression de leurs facteurs de transcription clés, T-BET, EOMES et STAT4 (359, 382, 385, 386); ainsi que la différenciation Th2 en inhibant GATA3 (387). En contrepartie, TGF- β peut favoriser la différenciation de certaines sous-populations inflammatoires, telles que les Th17 et les Th9. En effet, en association avec l'IL-4, le TGF- β favorise la différenciation des Th9 en induisant l'expression du facteur de transcription PU.1 et la production de l'IL-9 (388-390). De même, le TGF- β , en synergie avec l'IL-6, l'IL-1 β , l'IL-23 et l'IL-21, peut favoriser la différenciation Th17 des LT CD4⁺, en soutenant directement l'expression du facteur de transcription clé de cette voie, ROR γ t chez la souris (ou RORC chez l'humain) (391), ou indirectement *via* l'inhibition de T-BET et GATA3, les facteurs de transcription dominants de la voie Th1 et Th2, respectivement (392-394). Cependant, à de fortes concentrations, le TGF- β peut inhiber la différenciation Th17 en faveur de celle des Treg en inhibant l'expression du

récepteur de l'IL-23 et en induisant l'expression du FOXP3 qui inhibe l'expression de ROR γ c (395). De plus, le TGF- β , en synergie avec l'IL-6 peut favoriser la différenciation d'une sous-population régulatrice des Th17, qui expriment fortement le récepteur AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) et qui produit de l'IL-10 (396, 397). Enfin, TGF- β est connu pour son rôle déterminant dans la promotion de la différenciation des LT CD4⁺ en Treg, en induisant l'expression du facteur de transcription clé de cette voie, le FOXP3 (370, 398), qui eux-mêmes produisent du TGF- β comme facteur immunosuppresseur (395).

Plus récemment décrit, le TGF- β semble jouer un rôle important dans la différenciation et la survie des LT mémoire. Plusieurs études ont montré que le TGF- β favorise la survie des LT mémoire (385, 399, 400). En effet, il a récemment été démontré que le TGF- β induisait l'expression de Zeb1 et inhibait celle de Zeb2, facteurs de transcription favorisant la survie des lymphocytes T mémoire (en induisant la molécule pro-apoptotique BCL-2) et la différenciation des lymphocytes T effecteurs terminaux, respectivement, dans un modèle d'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire murin (243). De plus, une étude récente dans un modèle infectieux murin a révélé qu'une signalisation continue du TGF- β était nécessaire à la formation et au maintien des LT CD8⁺ mémoires (400). En effet, en abrogeant le récepteur du TGF- β dans des LT spécifiques de l'antigène, à différents timing, suite à une infection aiguë, les auteurs ont démontré que pendant la phase effectrice d'une réponse immunitaire, le TGF- β restreint les signaux inflammatoires associés à l'infection. Par la suite, durant la phase mémoire, la signalisation de TGF- β coopère avec les signaux inflammatoires basaux induits par le microbiome pour former la population de lymphocytes T mémoire. Enfin, le TGF- β favorise la différenciation d'une sous-population de LT CD8⁺ récemment décrite, les Trm (*resident memory T cells*) et qui a pour principale caractéristique d'être

résidante dans les tissus non-lymphoïdes. Le TGF- β induit potentiellement l'expression du CD103, une intégrine favorisant le contact direct avec les épithéliums et régule négativement l'expression de KLF2, un facteur de transcription favorisant la sortie des LT des organes lymphoïdes secondaires. La régulation négative de KLF2 entraîne une diminution de l'expression du récepteur 1 de la sphingosine-1-phosphate (S1P1), ce qui permet la rétention des lymphocytes T dans les tissus (251, 253). De plus, il a été montré que la différenciation Trm s'appuyait sur la régulation négative de T-BET et EOMES, qui peut être médiée par TGF- β (253, 254), comme dans l'inhibition de la différenciation Th1.

Le rôle immunorégulateur du TGF- β ne se limite pas au compartiment des lymphocytes T. Le TGF- β exerce des propriétés immunorégulatrices sur tous les acteurs du système immunitaire.

Dans les lymphocytes B, le TGF- β inhibe la prolifération et la production d'anticorps, mais favorise en contrepartie la production d'anticorps IgA (359). Dans le microenvironnement tumoral, le TGF- β favorise une polarisation anti-inflammatoire, M2, des macrophages infiltrant la tumeur (TAM) en inhibant NF κ B (354).

Le TGF- β inhibe la production d'IFN- γ et l'expression de T-BET, ainsi que la production de molécules cytolytiques par les cellules NK (363, 401, 402). Le TGF- β inhibe également l'expression de NKp30 et NKG2D, des récepteurs nécessaires à l'activation des NK, entraînant une diminution de la capacité des cellules NK à reconnaître et à tuer leurs cibles (403).

Le TGF- β peut influencer les cellules dendritiques (DC) de différentes façons. D'une part, il est essentiel à la formation des cellules de Langerhans (404). D'autre part, il peut bloquer la maturation des cellules dendritiques en inhibant l'expression des complexes MHC de classe II et des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) à la surface ainsi que la production des cytokines, TNF- α , IFN- α , IL12 et de la chimokine, CCL5 (359, 405). Ceci inhibe la capacité des DC à mobiliser une réponse T et favorise la formation de Treg.

Sur les neutrophiles, TGF- β agit comme un puissant facteur chimiotactique, favorisant leur migration, mais pas leur dégranulation ni leur activation (359). Le TGF β peut affecter indirectement la migration des neutrophiles en régulant l'expression des molécules d'adhésion dans l'endothélium (406, 407). Il peut également inhiber la cytotoxicité des neutrophiles (408). Comme pour les macrophages, le TGF- β favorise une polarisation anti-inflammatoire, N2, des neutrophiles infiltrant la tumeur (TAN), qui participent à l'angiogenèse tumorale et les métastases (409).

Enfin, TGF- β agit également comme un puissant chemottractant pour les MDSC (*Myeloid-derived suppressor cells*) et promeut leurs fonctions suppressives (410). De plus, la signalisation du TGF- β favorise la différenciation des MDSC en cellules mononucléées myéloïdes différenciées de façon terminale, qui contribuent à l'angiogenèse, à la suppression immunitaire et à la progression tumorale (411).

L'ensemble de ces données révèle que l'impact du TGF- β dépend du contexte (c'est-à-dire la présence d'autres signaux et le stade d'activation et de différenciation des cellules), du moment de l'exposition et de la concentration. Par conséquent, le succès de la modulation de

la signalisation du TGF- β dans le traitement du cancer dépendra probablement de ces importantes variables.

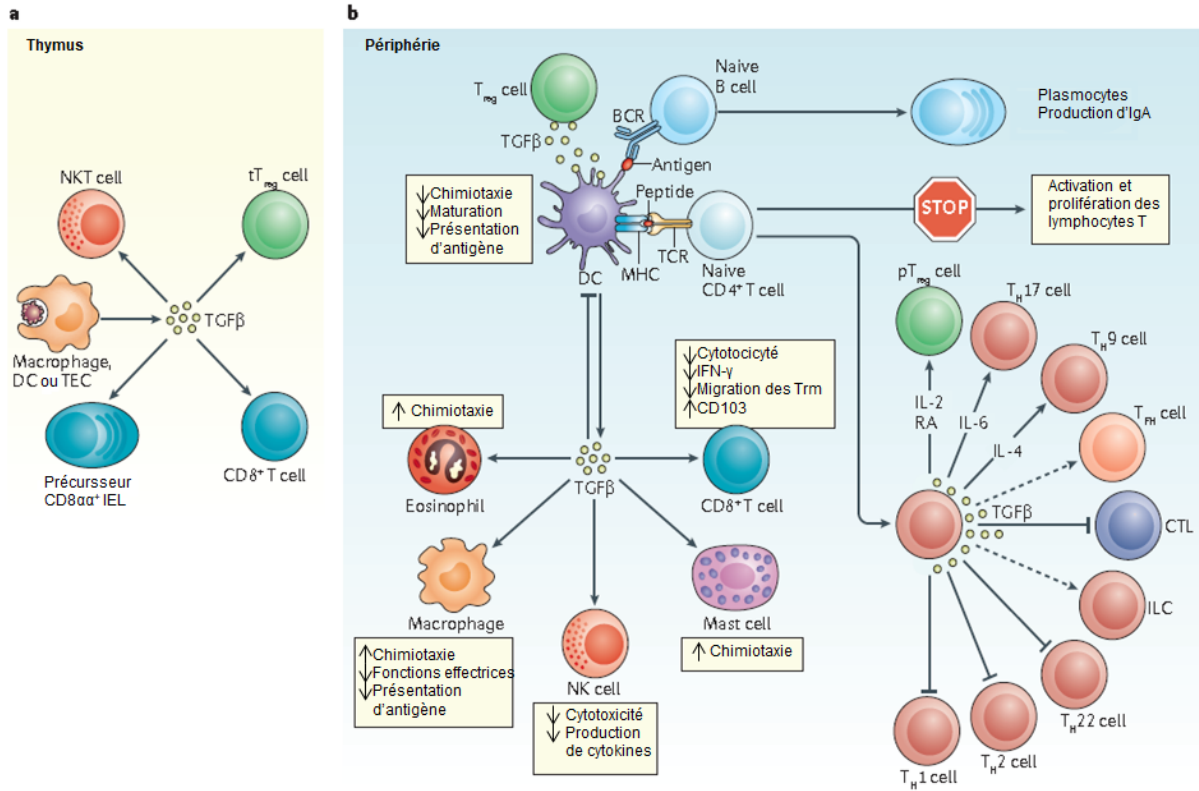


Figure 12: Régulation des cellules du système immunitaire par le TGF- β (adaptée de (339))

2.3 Rôle du TGF- β dans le cancer et son implication en IA

Un grand nombre de tumeurs produisent des taux élevés de TGF- β , notamment les mélanomes, les cancers du sein, du côlon, de l'œsophage, de l'estomac, du foie, des poumons, du pancréas et de la prostate, ainsi que les hémopathies malignes (412, 413). D'autre part, des déplétions ou des mutations dans les gènes codant pour les récepteurs du TGF- β et les Smads

peuvent provoquer un développement tumoral spontané dans des modèles murins et sont corrélés à un mauvais pronostic vital dans les cancers humains (414, 415). Les récepteurs TGF- β R de type I et II ainsi que les protéines Smad sont mutées dans plusieurs cancers (414-416). De plus, les tumeurs peuvent favoriser la production du TGF- β par les cellules environnantes dans le microenvironnement tumoral (417). Ceci suggère une implication des voies de signalisation de TGF- β dans le processus de tumorigenèse. Le rôle de la voie de signalisation du TGF- β dans la suppression et la progression du cancer a fait l'objet de nombreuses études. Aux premiers stades de la tumorigenèse, le TGF- β semble agir en tant que suppresseur de tumeur. Les études sur le rôle suppresseur de la signalisation du TGF- β dans la progression tumorale suggèrent qu'il pourrait inhiber la formation des tumeurs principalement par l'inhibition de la prolifération et par l'induction de l'arrêt de la croissance et l'apoptose (418, 419). Au fur et à mesure du développement tumoral, les cellules tumorales acquièrent des modifications génétiques et épigénétiques, touchants les effecteurs majeurs de la voie de signalisation de TGF- β , principalement T β RI, T β RII et Smad4 (420), ce qui entraîne le renversement de l'effet anti-tumoral du TGF- β à un effet pro-tumoral favorisant la croissance et l'invasion tumorale. En effet, pendant des phases plus avancées de la tumorigenèse, le TGF- β agit comme un puissant inducteur de l'angiogenèse, de l'inflammation, de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et de la suppression immunitaire, favorisant ainsi la progression tumorale et les métastases (421, 422). Dans le microenvironnement tumoral, TGF- β est produit par une variété de cellules, incluant les cellules tumorales, les fibroblastes, les LT conventionnels et régulateurs et les cellules myéloïdes. Ce TGF- β inhibe directement l'activation des lymphocytes T et favorise globalement leur différenciation en cellules immunorégulatrices. De plus, le TGF- β accentuera la suppression de la réponse T

indirectement en inhibant la maturation des cellules dendritiques, des macrophages et des neutrophiles, et en favorisant leur polarisation en cellules anti-inflammatoires, limitant ainsi la présentation antigénique et la sécrétion de cytokines promotrices de la voie Th1 (354, 409, 423).

Les études épidémiologiques et biologiques impliquant le TGF- β dans la promotion et la progression de la tumeur ont fortement justifié le développement de nombreux inhibiteurs du TGF- β , en tant qu'agents thérapeutiques pour les cancers avancés (424, 425), qui sont actuellement testés pour le traitement de nombreux cancers humains. Cependant, il existe actuellement peu de données cliniques démontrant des réponses objectives substantielles en réponse au blocage du TGF- β en monothérapie. Le développement de thérapies de combinaison en association avec des stratégies immunothérapeutiques puissantes pourrait constituer la meilleure approche pour exploiter le potentiel de l'inhibition du TGF- β pour améliorer les réponses anticancéreuses. Plusieurs stratégies ont déjà visé la combinaison d'un blocage du TGF- β à d'autres immunothérapies, telles que les anticorps agonistes d'OX40 (426), l'IL-2 (427), les virus oncolytiques (428), la vaccination (429-432) ainsi que les inhibiteurs de points de contrôle PD-1/PDL1 (433, 434). Les résultats pré-cliniques obtenus sont pour la plupart encourageants, mais doivent être confirmés dans des tests cliniques. En IA, de nombreux modèles précliniques ont montré que la modification génétique de LT (CARs ou naturels), activés *ex-vivo*, pour exprimer un récepteur dominant négative du TGF- β (dnTGF β R2) améliore l'efficacité de l'IA (221, 435-438). Une étude clinique a récemment rapportée que le TA de LT spécifiques du virus Epstein-Barr (EBV) et surexprimant un dnTGF β R2 a huit patients atteints de lymphome Hodgkinien EBV⁺ réfractaire a apporté des réponses partielles ou complètes chez la moitié des patients sans effets secondaires

significatifs (439). Ces résultats encourageants devraient néanmoins être confirmés dans des plus grandes cohortes. Nous avons récemment publié un article de revue (complétant cette introduction) qui traite plus en détail du rôle du TGF- β dans une perspective d'immunothérapie du cancer (Annexe 1).

A contre-courant de tout ce que nous venons de voir sur l'inhibition du TGF- β pour améliorer la réponse anti-tumorale ainsi que l'efficacité des autres immunothérapies, nous proposons d'exploiter les effets bénéfiques du TGF- β sur la différenciation mémoire des LT pour améliorer l'efficacité de l'IA. En effet, si les LT mémoires sont plus efficaces en IA et que le TGF- β permet d'en assurer la différenciation et le maintien, il est plausible que celui-ci puisse favoriser les réponses anti-tumorales.

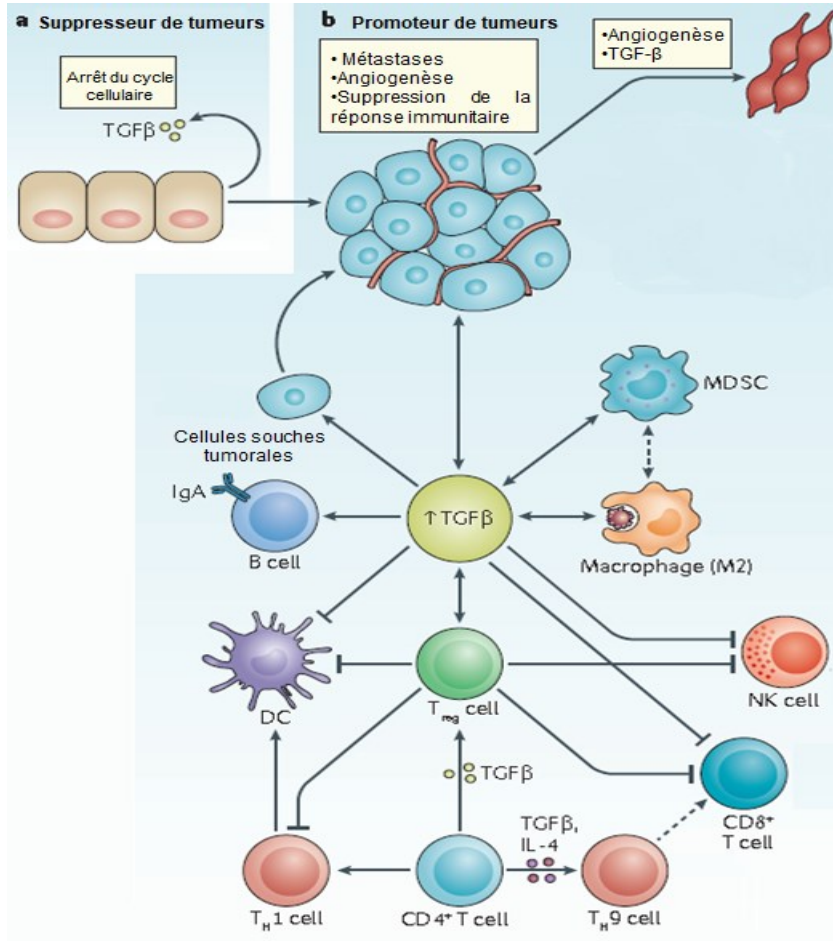


Figure 13: Effets du TGF-β sur la réponse immunitaire dans le microenvironnement tumoral (adaptée de (339))

Hypothèse et objectifs

Au cours des dernières décennies, l'immunothérapie adoptive a émergé comme une thérapie prometteuse pour le traitement des cancers avancés résistants aux traitements conventionnels. Toutefois, son efficacité reste limitée notamment en raison de l'incapacité des LT transférés à persister à long terme chez les patients et assurer une réponse anti-tumorale efficace et durable (207). En effet, les protocoles qui sont actuellement utilisés pour générer les lignées anti-tumorales induisent leur différenciation terminale et leur épuisement fonctionnel, ce qui réduit leur capacité à s'auto-renouveler et à persister à long terme. Plusieurs évidences indiquent que le transfert adoptif de LT moins différenciés, tels que les Tscm (*stem cell memory T cells*) ou les Tcm (*central memory T cells*), ayant une meilleure capacité à s'auto-renouveler, à proliférer, à persister et à se différencier en LT effecteurs capables d'éliminer la tumeur, permettrait d'induire une meilleure efficacité thérapeutique (207). Ainsi, le transfert adoptif de LT peu différenciés, idéalement des Tscm ou des Tcm, serait souhaitable afin d'induire une réponse anti-tumorale efficace et durable à long terme.

Le TGF- β est une cytokine pléiotropique qui régule une multitude de processus biologiques. Dans le système hématopoïétique, le TGF- β est reconnu comme étant un facteur de quiescence qui inhibe la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en contrôlant le cycle cellulaire, ce qui est nécessaire au maintien de leur fonction à long terme dans des conditions homéostatiques (440, 441). Dans les LT matures, le TGF- β est surtout connu pour ses effets immunorégulateurs, notamment par l'inhibition de l'activation, de la différenciation et des fonctions effectrices des LT conventionnels ou par la génération des LT régulateurs (Treg) (442). Cependant de récentes études ont révélé un rôle potentiel du TGF- β

dans la différenciation et le maintien des LT mémoire. En effet, une étude a révélé l'importance d'une signalisation continue du TGF- β pour former et préserver l'identité des lymphocytes T CD8⁺ mémoire à la suite d'infections aiguës (400). D'autre part, la découverte récente d'une nouvelle population de LT mémoire résidants dans les tissus non lymphoïdes (Trm) a permis d'identifier le TGF- β comme un facteur clé dans le maintien de cette population dans les muqueuses. Notamment, le TGF- β , induit l'expression du CD103 qui permet la rétention des Trm dans l'épithélium, potentiellement par le biais de son interaction avec l'E-cadhérine sur des cellules épithéliales (315, 443, 444). De plus, il instruit un programme transcriptionnel (inhibe KLF2, T-BET et EOMES et induit NOTCH) qui favorise la rétention des Trm dans les tissus. La présence des Trm dans différents cancers humains suggèrent leur rôle primordial dans la réponse spécifique anti-tumorale (231).

Ainsi, de nombreux éléments supportent l'hypothèse que l'utilisation du TGF- β dans des cultures de LT activés *ex-vivo* pourrait favoriser leur différenciation mémoire et ainsi améliorer leur potentiel thérapeutique en immunothérapie adoptive.

Les objectifs de cette thèse consistent à:

1- Evaluer le rôle du TGF- β dans la différenciation mémoire des LT humains activés *ex-vivo* et son impact sur l'efficacité de l'immunothérapie adoptive dans un modèle de xénogreffe avec des CAR-T dirigés contre BCMA (*B-cell maturation antigène*).

2- Evaluer le potentiel du TGF- β à améliorer la migration et la rétention des LT-OT-I stimulés *ex-vivo* vers le site de la tumeur, dans un modèle murin de carcinome pulmonaire exprimant le peptide OVA (Lewis Lung Carcinoma-LLC-OVA).

Résultats

Article 1: TGF- β programs central-memory differentiation in ex vivo stimulated human T cells

Cet article a été accepté dans le journal "Cancer Immunology Research" et est en cours de publication.

Cet article a mis en lumière le rôle du TGF- β dans la différenciation mémoire des LT humains et le potentiel de son utilisation en IA pour en améliorer l'efficacité. Il répond donc au premier objectif de ma thèse.

Contributions détaillées de chacun des auteurs : J'ai effectué la majorité des expériences dans cet article, soit environ 75%. Cédric Carli a effectué 20% des expériences tandis que Manon Richaud en a fait 5%. Myriam Khalili a participé aux premiers tests qui ont permis de démarrer le projet. Mathieu Goupil et Caroline Lamarche ont contribué à des expériences qui nous ont aidés à l'avancement du projet, mais qui ne figurent pas dans le manuscrit.

Valérie Janelle a réalisé les analyses du séquençage d'ARN ainsi que les analyses statistiques de l'ensemble des résultats du manuscrit. Ksenia Bezverbnaya, étudiante au doctorat dans le laboratoire de Dr. Jonathan L. Bramson nous a fournis les virus qui ont servi à transduire les CARs ainsi que la lignée tumorale KMS11. Ma contribution conceptuelle à cet article avec Jean-Sébastien est de 50%. Enfin, Jean-Sébastien a rédigé 75% de l'article. J'ai participé à la rédaction de la partie "matériel et méthodes", légende des figures, et réalisé les figures. Valérie et Jean-Sébastien ont reformaté l'ensemble des figures sur Illustrator. Bien sûr, Jean-Sébastien a supervisé chacune des étapes.

TGF- β programs central-memory differentiation in *ex vivo* stimulated human T cells

Amina Dahmani¹, Valérie Janelle¹, Cédric Carli¹, Manon Richaud¹, Caroline Lamarche^{1,2},
Myriam Khalili¹, Mathieu Goupil¹, Ksenia Bezverbnaya³, Jonathan L. Bramson³ and Jean-
Sébastien Delisle^{1,4,5}

¹ Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (CRHMR)

² Department of Surgery, University of British Columbia and BC Children's Hospital
Research Institute

³ Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton,
Ontario, Canada

⁴ Département de médecine, Université de Montréal

⁵ Hematology-oncology division, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

Running title: Early memory T-cell differentiation by TGF- β

Word count: 5006

Abstract

The adoptive transfer of *ex vivo* expanded T cells is a promising approach to treat several malignancies. Several lines of evidence support that the infusion of T cells with early memory features, capable to expand and persist after transfer, are associated with better outcomes. We report herein that exposure to exogenous transforming growth factor-beta (TGF- β) during human T-cell stimulation *ex vivo* leads to the accumulation of early/central memory (Tcm) cells. Exposure to TGF- β suppressed the expression of BLIMP-1, a key orchestrator of effector T-cell differentiation, and led to the upregulation of the memory-associated transcription factor ID3. Accordingly, this was associated with an early memory transcriptional signature in both CD4 and CD8 T-cell subsets. The T cells stimulated in the presence of TGF- β expanded normally, displayed polyfunctional features and no suppressive activity. The adoptive transfer of *ex vivo* stimulated T cells into immunodeficient mice confirmed that TGF- β conditioned cells had an enhanced capacity to persist and mediate xenogeneic graft-versus-host disease, as predicted by their early T-cell memory phenotype. Furthermore, chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells generated in the presence of exogenous TGF- β were cytotoxic and more effective at controlling tumor growth in immunodeficient animals. This work unveils a new role for TGF- β in memory T-cell differentiation and indicates that TGF- β signaling may be harnessed to program Tcm differentiation in the context of *ex vivo* T-cell stimulation for adoptive immunotherapy in humans.

Introduction

The integration of stimulatory signals during T-cell activation programs the differentiation of effector and memory T cells. According to the progressive differentiation model, T cells differentiate depending on the nature and strength of activation signals following a one-way linear path from naïve to early memory (stem cell memory – Tscm- and central memory - Tcm), effector memory (Tem) and finally terminally differentiated effector T cells (Teff) (207). Hence, the gradual acquisition of effector features resulting from “strong” activation signals is associated with a decreased potential for long term memory T-cell generation and persistence. Although challenged by evidence supporting the possibility to revert from effector to long lived memory T cells (445), a consensus in T-cell adoptive immunotherapy is to use *ex vivo* expanded “early memory” Tcm and Tscm capable to proliferate and persist *in vivo* after transfer (268, 281, 446, 447). Thus, the use of various cytokine combinations, the alteration of metabolic pathways and the modulation of signaling cascades involved in T-cell memory or effector fate determination are widely pursued to confer Tcm or Tscm characteristic to *ex vivo* manipulated T cells for therapy (222, 268, 281, 446-448).

The cytokine TGF- β has pleiotropic effects in the hematopoietic system (440, 449). Though primarily known for its immunoregulatory and anti-proliferative properties, TGF- β orchestrates both T-cell regulatory (TReg) and inflammatory subset differentiation depending on the presence of additional signals (450-453). This pleiotropy is further exemplified by the contrasting pro-survival effects of TGF- β on naïve and memory T cells, and the pro-apoptotic and functional inhibitory effects on differentiated effector T cells (399, 400, 454). The role of TGF- β in memory T-cell differentiation remains incompletely understood, but given the

potential of this cytokine to mitigate T-cell activation signals (375, 379), one may expect that TGF- β exposure during T-cell activation may favor early memory differentiation.

We show herein that exogenous TGF- β exposure during human T-cell stimulation *ex vivo* favors Tcm differentiation. In the presence of TGF- β , the transcriptional regulator of effector T-cell differentiation BLIMP-1 was suppressed and ID3, a master regulator of T-cell memory differentiation was induced correlating with an early T-cell memory transcriptional signature (234, 455). The T cells generated in TGF- β -supplemented conditions expanded normally and displayed increased polyfunctional cytokine secretion relative to unexposed T cells, in keeping with early memory differentiation (207). The adoptive transfer of activated T cells in immunodeficient mice revealed that TGF- β exposure in culture conferred an enhanced capacity to expand, persist and mediate xenogeneic graft-versus-host disease (GVHD) as previously reported for cells with Tscm features (268). Similarly, chimeric-antigen receptor (CAR) modified T cells transduced and expanded in TGF- β -supplemented culture were more effective at controlling tumor growth *in vivo*. Hence, the TGF- β pathway can be used to program early memory differentiation in human T cells and has therefore immediate relevance for the field of adoptive immunotherapy.

Matériaux et Méthodes

Ex vivo T-cell cultures, proliferation and apoptosis assays

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by venipuncture from healthy volunteers according to institutional policies. A total of 1×10^5 T cells (enriched using the Human T cell enrichment kit - StemCell Technologies) were stimulated in 96-well U-bottom culture plates with 5 $\mu\text{g/ml}$ plate-bound anti-CD3e (UCHT1; BD Biosciences,) and 1 $\mu\text{g/ml}$ soluble anti-CD28 (CD28.2; BD Biosciences), in T-cell media (Advanced RPMI 1640 – from Gibco, 10% human serum and 1X L-glutamine - Sigma-Aldrich) with Penicillin-Streptomycin Solution (Sigma-Aldrich) at 37°C and 5% CO₂. Recombinant human TGF- β (active form) was used at 5 ng/ml (Feldan). IL-7 (10ng/ml), IL-15 (5ng/ml) (Miltenyi Biotec), IL-2 (100 U/ml) (Stem Cell technologies), the type I and II TGF- β receptor kinases inhibitor GW788388 (456) (Selleckchem), were used as indicated. At days 3, 7 and 11, half of the media was replaced. For pathogen-specific T-cell line generation, 1×10^6 PBMCs from healthy volunteers were co-cultured in 24-well flat-bottom culture plates with autologous irradiated (40 Gy) mature dendritic cells (DCs) (457), loaded with 1 $\mu\text{g/mL}$ overlapping peptide libraries (JPT peptides), at a 1:10 ratio (stimulator: responder) in T-cell media supplemented with IL-7 (10 ng/mL), IL-15 (5 ng/mL) and TGF- β (5ng/ml) when indicated (Feldan). Re-stimulations of T cells with antigen loaded DC were performed weekly and half media changes were performed twice a week. ELISpot assays (Mabtech Inc) and corresponding spot forming cells and activity per 1×10^5 were counted using a vSpot Reader Spectrum (AID) according the manufacturers' instructions. For proliferation and apoptosis assays, T cells were labeled with 1 μM CellTrace™ Violet (CTV) (Invitrogen), as previously described (458). Viability and apoptosis

were evaluated with Annexin V (AV) (BD Biosciences) and Propidium Iodide (PI) (2.5 µg/ml; Invitrogen).

Flow cytometry

Antibodies targeting the following antigens (name of clone in parenthesis) were purchased from BD Biosciences: CD3 (SK7), CD4 (RPA-T4), CD8 (RPA-T8), CD45RA (5H9), CD45RO (UCHL1), CD95 (DX2), CCR7 (150503), CD62L (DREG-5 6), CD27 (M-T271), CD28 (CD28.2), CD127 (HIL-7F-M21), IL-2 (MQ1-17H12), IFN- γ (4S.B3), TNF- α (MAb11), and FOXP3 (PCH101). The anti-CD271 (ME204) antibody was purchased from Biolegend. For functional analysis, T cells were restimulated with PMA (50 ng/ml), ionomycin (500 ng/ml) (Sigma-Aldrich), CD28 and CD49d (1 µg/mL) (BD Biosciences) in the presence of brefeldin A at 7.5 µg/mL (Sigma-Aldrich). All data were acquired on a LSR II flow cytometer and sorting was performed using a FACS Aria III sorter (both from BD Biosciences). Data were analyzed with DIVA Version 8.7 software (BD Biosciences), Flow Logic software (Inivai Technologies) or FlowJo V10 software (Tree Star).

Western blotting

An equal number of cells per condition were used. Protein extraction was done in Laemmli Lysis-buffer and resolved on 10% SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Anti-phospho SMAD3 (EP823Y; 1:2000 Abcam), anti-SMAD3 (EP568Y; 1:2500 Abcam), anti-ID3 (D16D10; 1:700; Cell Signaling), anti-BLIMP1 (C14A4; 1:700; Cell Signaling), β -actin (Ab-5; C4/actin; BD Biosciences) and HRP-conjugated secondary antibody (1:3000; Cell signaling) were used. The Amersham ECLTM Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) was used for revelation.

Gene expression studies and regulatory T cell-specific demethylation region (TSDR) analysis

Quantitative PCR (RT-PCR) analyses were performed as described previously(448) using the TaqMan system and the Viiia7 qPCR instrument and analysed using the Expression Suite software (all from Life Technologies). Transcript expression was normalized to *GAPDH*. For next-generation sequencing all reagents and devices were from Thermo Fisher Scientific. Samples were prepared using 35ng total RNA that was reverse transcribed, amplified (Ion Ampliseq Transcriptome Human Gene Expression Core Panel targeting 20812 RefSeq genes). Libraries were generated and barcoded using Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 kit, quantified with the Ion Library Quantitation Kit and loaded on the Ion Chef instrument (Ion PI Hi-Q Chef Kit) for template preparation and loaded on Ion P1 v3 chips. Each sample was sequenced and aligned to the human reference genome (hg19) using the Torrent Suite software v5.0.5. Raw read counts were generated by the ampliSeqRNA plugins. The data were analyzed using Bioconductor packages (<http://www.bioconductor.org/>) and R statistical language (www.r-project.org). Differentially expressed gene analysis was performed using the DESeq2 package version 1.6.3 with raw read counts from AmpliSeq. The data can be found in the Gene Expression Omnibus (number GSE87508). The TSDR analysis for *FOXP3* promoter methylation status was performed on male T cells as previously described (459). Briefly, after DNA bisulfite conversion (EZ DNA Methylation-Direct Kit, Zymo Research) and PCR (Human FOXP3 Kit, Epigen DX), pyrosequencing was performed on a Biotage PyroMark Q96 MD pyrosequencer (QIAGEN) and analyzed with the Pyro Q-CpG software (Biotage).

Cytokine quantification and T-cell suppression assay

Cytokine levels were measured as previously described(448) using the Human Th1/Th2/Th17 Magnetic 8-Plex Panel (Life Technologies). Data were acquired on a MagPix instrument (BioRad). T-cell suppression assays used anti-CD3/CD28 stimulated (as described above) or sorted T cells (suppressors) added to a mixed lymphoid reaction where CTV-labeled responder T cells (autologous to cultured cells) were mixed with allogeneic irradiated PBMC (stimulator), at 1:1:1 and 1:1:8 ratios (stimulator: responder: suppressor). After 6 days, the proliferation of responder T cells was analyzed by flow cytometry.

***In vivo* models of GVHD and adoptive immunotherapy in NOD/SCID/IL2R γ ^{null} mice**

For GVHD induction, eight- to 12-week-old NOD/SCID/IL2R γ ^{null} (NSG) mice received total body irradiation (250 cGy) one day prior to i.v. injection of 0.5×10^6 T cells that had been stimulated for 7 days with anti-CD3/CD28 antibodies in the presence or absence of TGF- β (5ng/ml). Human recombinant rhIL-15 (1 μ g, 2000 U; Miltenyi Biotec) was administered intraperitoneally every 2 to 3 days for 3 weeks after transplant. For evaluation of anti-tumoral responses, second generation B-cell maturation antigen (BCMA)-specific CAR (described in(460)) were transduced by lentivirus on day 2 of CD3/CD28 stimulation (TransAct, Miltenyi Biotec) in the presence of IL-7 (10ng/ml), IL-15 (5ng/ml) +/- TGF- β (5ng/ml) and expanded for 7 days prior to adoptive transfer or cytotoxicity assays. To evaluate the specific cytotoxicity of BCMA-CART cells treated or not with TGF- β , human BCMA-expressing KMS11 cells (Jonathan Bramson, McMaster University) and Jurkat cells (BCMA negative control, ATCC) were labeled with either Cell Trace Violet (CTV) or Cell Trace Yellow (CTY) (Invitrogen Life Technologies) and plated at equal numbers (2.5×10^4) before co-culture with

BCMA-CART cells in a U bottom 96-well plate (Sarstedt) at indicated effector:target ratio for 16 h at 37 °C. After co-culture, tumor cell viability was determined by flow cytometry, using Flow Count Beads (Beckman Coulter). Tumor cell viability was calculated as: $(100 - (\text{Target cell alive} / \text{Target cell alone}) \times 100)$. To assess the *in vivo* antitumor response of TGF- β treated-CART cells a total of 2×10^5 CART cells (approximately 2×10^6 total T cells) were injected to NSG mice bearing enhanced firefly luciferase(461) transduced KMS-11 cells (10^6 KMS-11 cells injected intravenously 7 days prior to adoptive transfer). In order to delay the occurrence of GVHD, recipient mice did not receive irradiation. Bioluminescent imaging was performed weekly 10 minutes after the intraperitoneal injection of 150 mg/Kg of fresh sterile D-Luciferin solution (PerkinElmer). Dorsal and ventral views were obtained using an IVIS Spectrum (IVIS100 IVIS lumina system, Caliper LifeSciences). Images were analyzed using Living Image Software version 4.5 for Windows (PerkinElmer). Peripheral blood sampling was performed weekly to monitor CART cell persistence and recipients were sacrificed at day 35 post tumor inoculation. Mice were maintained in a specific pathogen-free environment the study was approved in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines at Hôpital Maisonneuve-Rosemont (protocol #2016-FE-002).

Statistical analysis

Unless otherwise specified, all statistical analyses were paired to best assess the impact of test conditions for every donor and performed using the Wilcoxon signed rank test or student t-test depending on data distribution (assessed by the Shapiro-Wilk test) using the IBM SPSS statistics 21 software or R statistical language (www.r-project.org). *p* values < 0.05 were considered significant.

Résultats

1. Exposure to exogenous TGF- β during T-cell activation leads to Tcm accumulation

Total T cells from healthy donor volunteers were stimulated with plate-bound anti-CD3 and soluble anti-CD28 in the presence or absence of exogenous TGF- β . The expression of CD45RO and CD62L on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells were used to assess for Tcm (CD45RO⁺/CD62L⁺) and Tem (CD45RO⁺/CD62L⁻) differentiation. T cells were stimulated and incubated in parallel with the TGF- β receptor I and II kinase inhibitor GW788388 (456), given previous reports showing that autocrine TGF- β can have important effects on T-cell activation and differentiation (451, 462) (Figure 1A-C). The addition of TGF- β rapidly induced, while GW788388 suppressed, the phosphorylation of the canonical TGF- β mediator SMAD3 (Supplementary Figure S1). After 7 days in the culture, nearly all cells could be identified as Tcm or Tem (Figure 1 A-B). The percentage of Tcm was significantly increased, and reciprocally the percentage of Tem was decreased upon exposure to exogenous TGF- β for both CD4⁺ T and CD8⁺ T cells at day 7. The same pattern persisted after 14 days in culture, reaching statistical significance in CD4⁺ T cells. Likewise, CCR7, the other widely used Tcm marker, was expressed by a significantly greater percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells after TGF- β exposure at both day 7 and day 14 (Figure 1A, C). Conversely, the inhibition of autocrine TGF- β signaling with GW788388 favored Tem over Tcm accumulation. The impact of TGF- β supplementation or signaling blockade was more modest for the expression of the other memory markers CD27, CD28 and CD127 (Supplementary Figure S2). However, a statistically significant difference was noted for the proportion of CD27 expressing T cells

(lower in the TGF- β condition) and a slightly lower proportion of GW388788 treated T cells expressed CD127 and CD28 (CD8⁺ T cells only).

We next assessed whether TGF- β exposure could favor Tcm marker expression on different T-cell populations. To this end, we sorted naïve (CD45RA⁺/CD45RO⁻/CD62L⁺/CCR7⁺/CD95⁻), bulk memory (CD45RO⁺/CD45RA⁻) as well as Tem (CD45RO⁺/CD45RA⁻/CD62L⁻/CCR7⁻) and Teff (CD45RO⁻/CD45RA⁺/CD62L⁻/CCR7⁻) CD4⁺ and CD8⁺ T cells. For both naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells, TGF- β exposure during stimulation yielded a higher percentage of Tcm relative to the control condition (Figure 1D-E). The same observation was made following the stimulation of sorted CD4⁺ and CD8⁺ bulk memory T cell populations (Figure 1D-E). Autocrine TGF- β signaling blockade had no effect. Sorted Tem mostly kept their phenotype after stimulation irrespective of TGF- β exposure, while sorted and stimulated Teff mainly died or reverted to a Tem phenotype (CD8⁺ from 2 out of 4 donors) in both TGF- β supplemented and control conditions (Supplementary Figure S3). Globally, these data imply that TGF- β exposure favors Tcm differentiation in human T-cell cultures through effects on naïve and pre-existing early memory T cells.

We then assessed whether exogenous TGF- β exposure would likewise confer Tcm features to T cells expanded using naturally occurring antigens. To this end, we generated T-cell lines against Epstein-Barr Nuclear Antigen-1 (EBNA-1) antigenic peptides (463). Four weekly T-cell stimulations with autologous dendritic cells loaded with peptide libraries were performed in the presence of cytokines previously shown to favor early memory T-cell differentiation (IL-7 and IL-15)(268). Supplementation with TGF- β during the first 2 weeks increased the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ expressing CCR7 at day 14 by roughly 20% (Supplementary Figure S4). Despite repeated antigen stimulations in the absence of exogenous TGF- β beyond

day 14, CCR7⁺ T cells and CD62L-expressing CD4⁺ T cells were found in higher proportions in T-cell lines previously exposed to TGF- β at day 28. As opposed to T cells stimulated with anti-CD3/CD28, antigen stimulated T cells in the presence of TGF- β expressed CD27 in higher proportion relative to unexposed T cells but no effects were found for CD127 and CD28 expression. Finally, the addition of TGF- β did not limit the generation of antigen-reactive T cells. We conclude that early TGF- β exposure during T-cell stimulation with either anti-CD3/CD28 or antigenic peptides globally favors Tcm marker expression.

2. TGF- β confers an early memory gene expression signature to ex vivo stimulated T cells

It was previously found that TGF- β suppresses BLIMP-1 (encoded by *PRDMI*), a central regulator of effector T-cell differentiation (313, 464). The transcriptional repressor BLIMP-1 inhibits memory differentiation, notably through *TBX21* induction (465) and the repression *ID3*, a key memory-associated transcription factor (455). Given the limited effect of autocrine TGF- β signaling inhibition in our system, we focussed on the impact of TGF- β exposure on the expression of BLIMP1 and ID3 in anti-CD3/CD28 stimulated T cells. Early after stimulation (72hrs), quantitative PCR revealed that the TGF- β exposed cells expressed lower *PRDMI* (coding for BLIMP-1) and tended to have higher *ID3* transcript levels relative to cells unexposed to TGF- β (Figure 2A-B). This translated in significant differences in protein levels for both BLIMP-1 and ID3 (Figure 2C-D). RNA sequencing performed on sorted CD4⁺ and CD8⁺ T cells after 7 days of culture linked this early pattern of BLIMP-1 and ID3 expression with the differential expression of several effector and memory genes between the two experimental conditions (207, 222, 234, 235, 381, 446, 447). Several transcripts associated

with effector differentiation were downregulated in TGF- β exposed cells relative to the reference condition. These included granzymes (*GZM*), FAS ligand-*FASLG*, *STAT4*, *SOCS3*, *ID2*, *IFN- γ* and the master transcription factor of effector T-cell differentiation transcripts *PRDMI* and *TBX21*. Conversely, and consistent with Tcm differentiation, TGF- β exposure led to higher expression of the memory-associated transcription factors transcripts *ID3*, *FOXP1*, *SOX4* and *FOXO1*. Globally, these results show that during T-cell activation, TGF- β mitigates BLIMP-1 and associated effector gene expression, and increases ID3 expression, which is associated with the expression of T-cell memory associated transcripts.

3. The effects of TGF- β on T-cell phenotypes are independent of T-cell expansion and are associated with improved polyfunctional cytokine secretion

After establishing that TGF- β favors Tcm differentiation at the phenotypic and gene expression levels, we sought to determine whether TGF- β impacted T-cell growth and function. Since TGF- β is known to restrict cellular proliferation and promote apoptosis of effector T cells (453), we next assessed whether the effects of TGF- β on differentiation marker expression were biased by a restriction in cellular expansion (273). Cell counts and flow cytometry analysis performed at days 3, 7 and 14 revealed that TGF- β did not significantly affect cell accumulation or the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 3A-B). Dye dilution proliferation assays and Annexin V/Propidium iodine staining showed no marked differences in proliferation or apoptosis rates between experimental groups (Figure 3C-E). Likewise, the addition of TGF- β did not compromise T-cell expansion relative to other commonly used cytokines for human T-cell stimulation/expansion (IL-2, IL-7 and IL-15) at

day 7 and 14 of culture, while leading to a higher percentage of Tcm (Supplementary Figure S5). Moreover, the effects of TGF- β on Tcm proportions were preserved when combined with these cytokines. Thus, the impact of TGF- β on Tcm differentiation was largely independent of T-cell expansion, survival or the presence of other cytokines.

We next aimed to determine whether TGF- β exposure during T-cell stimulation impacted functionality as TGF- β can inhibit the secretion of IFN- γ , TNF- α and IL-2 (381, 466). However, Tcm are known to secrete all three cytokines, with a skewing towards monofunctional IFN- γ secretion upon further effector differentiation (207). We assessed the impact of TGF- β exposure during T-cell stimulation on cytokine production by intracellular flow cytometry after briefly exposing day 7 and 14 T cells to PMA/ionomycin (Figure 4A). In order to correct for inter-donor variability, the percentage of cytokine producing cells was arbitrarily set at 1 in the reference condition (T cells stimulated in the absence of TGF- β) (Figure 4A-B). The percentage of IFN- γ , TNF- α and IL-2-producing T cells were not significantly different between TGF- β -exposed and unexposed T cells at day 7. However, at day 14, a higher fraction of TGF- β exposed CD8⁺ T cells were producing TNF- α and IL-2 but a lower percentage produced IFN- γ relative to control. When we assessed for polyfunctionality, a higher percentage of TGF- β exposed CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressed all three cytokines at day 14 (Figure 4C-D). Taken together, our results show that TGF- β leads to Tcm-associated cytokine secretion.

4. Brief TGF- β exposure during T-cell activation does not induce regulatory T-cell differentiation.

TGF- β has pleiotropic effects on T-cell differentiation which may interfere with the potency of T-cell immunotherapies, notably through the induction of regulatory T cells (Tregs) (467). Despite our data showing Th1/Tc1 cytokine secretion following activation in the presence of TGF- β , as well as previous work showing that TGF- β alone does not induce the a Treg fate in human T cells (468, 469), we sought to rule out Treg skewing following T-cell activation in the presence of TGF- β . Our gene expression data confirmed that *FOXP3*, along with the other Treg gene transcripts *IKZF2* (coding for Helios) and *IKZF4* (coding for Eos), were upregulated in T cells exposed to TGF- β relative to the control condition (Figure 5A). Although, FOXP3 is expressed in both activated conventional T cells and Treg in humans (470), it was imperative to show that TGF- β did not induce suppressive cells. A majority of anti-CD3/CD28 stimulated T cells expressed FOXP3 at the protein level after 7 days of culture, followed by a decline at day 14, in both control and TGF- β supplemented cultures (Figure 5B). In addition, TGF- β exposure alone (or with IL-2) did not lead to demethylation of the *FOXP3* promoter, which is a hallmark of stable Treg differentiation (Figure 5C). Moreover, suppression assays showed that the addition of activated T cells from both control and TGF- β supplemented cultures at day 7 did not suppress, but rather enhanced, the proliferative response of autologous T cells (labelled) mixed with irradiated allogeneic targets. This contrasted with conditions where either unstimulated T cells or sorted Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) from the same donors were added to the culture (Figure 5D-E). Moreover, IL-10 was undetectable in culture supernatants, further arguing against Treg skewing (Figure 5F). Finally, the cytokine arrays also failed to demonstrate significant or

differential IL-17 or IL-9 production in TGF- β supplemented cultures, respectively indicating that the TGF- β dependent Th17 and Th9 T-cell subsets are not expanded in our cultures (453). Our results confirm that the addition of TGF- β during the stimulation of T cells does not induce alternative differentiation schemes in our system.

5. TGF- β exposure confers an enhanced capacity to expand, persist and mediate alloreactivity after adoptive transfer in immunodeficient mice

Early memory T cells have a greater capacity to expand, persist and retain functionality following injection in immunodeficient mice (268, 281). In order to assess whether the observed Tcm bias conferred by TGF- β *in vitro* would translate into functional early memory T-cell features *in vivo*, T cells (5×10^5) were harvested at day 7 of anti-CD3/CD28 stimulation in the absence or presence of TGF- β and injected intravenously to NSG mice. Polyclonal early memory T cells are predicted to cause severe xenogeneic graft-versus-host-disease (GVHD) as opposed to their more differentiated counterparts (268). Weekly assessments of peripheral blood and spleen assessments four weeks after adoptive transfer showed that TGF- β conditioned T cells persisted at higher frequencies (Figure 6A-C). This translated in weight loss (Figure 6D) and signs of GVHD (ruffled fur, prostration) in the group that received TGF- β exposed cells, but not in the control group, confirming that TGF- β exposed cells had retained high functional xenoreactive capacity. Hence, TGF- β exposure during the early stages of T-cell activation programmed T-cell persistence, differentiation and function up to at least one month after infusion, as expected for early memory cells (268, 471). These data corroborate the *in vitro* phenotypic, functional and gene expression characteristics of *ex vivo* stimulated human T cells linking TGF- β to early T-cell memory differentiation.

6. TGF- β imparts Tcm features to genetically modified T cells *in vitro* leading to improved CAR T-cell therapy *in vivo*

Based on our GVHD data, where a brief exposure to TGF- β during T-cell stimulation *in vitro* led to different outcomes several weeks after adoptive transfer, we evaluated whether the Tcm promoting properties of TGF- β could be leveraged therapeutically. To this end, we used a myeloma xenograft model, where B-cell maturation antigen (BCMA) expressing KMS-11 cells genetically engineered to express luciferase are injected intravenously to NSG mice one week prior to the adoptive transfer of human T-cells expressing a BCMA-targeting CAR (BCMA-CART). We used a combination of anti-CD3/CD28 stimulation, IL-7, IL-15 and TGF- β (or not, in the reference condition) for transduction based on previous data highlighting the potential of IL-7/IL-15 combination to generate early memory T cells in this setting (472). Exogenous TGF- β enhanced the proportions of Tcm generated in the context of combined IL-7 and IL-15 supplementation, and did not affect the BCMA-CAR transduction rates (Supplementary Figure S6). After transduction and a 7-day expansion, cytotoxicity was assessed *in vitro* using BCMA-expressing KMS-11 cells and Jurkat cells as BCMA-negative controls (Figure 7A). Differentially labelled targets and control cells were co-incubated for 16 hours with BCMA-CART effectors at different ratios. The BCMA-specific killing of target cells was robust and equivalent whether the effectors had been exposed to TGF- β or not during transduction and expansion (Figure 7B), thereby confirming that a short exposure to TGF- β does not impede the acquisition of effector functions. Adoptive transfer of BCMA-CART in KMS-11 tumor-bearing NSG revealed that BCMA-CART exposed to TGF- β *in vitro* prior to transfer outcompeted their unexposed counterparts in terms of tumor control or eradication (Figure 7C-D and Supplementary Figure S7 for dorsal views). Weekly peripheral

blood assessments starting at day 14 after injection showed that TGF- β -exposed, were always found in greater numbers relative to unexposed BCMA-CART (statistically significant at day 14 after transfer) (Figure 7E). These data further support that *ex vivo* TGF- β exposure programs T-cell fates associated with high functionality in the context of adoptive immunotherapy.

Discussion

In the hematopoietic system, TGF- β is a quiescence factor that promotes stem cell as well as memory T cell maintenance and naïve T-cell survival (400, 440, 467). In addition, TGF- β has been shown to dampen signaling downstream of the T-cell receptor(378, 379) and CD28(473). We found that TGF- β increased the expression of early memory markers in activated human T cells in multiple culture settings, improved polyfunctional cytokine production without altering T-cell expansion or leading to Treg generation. Further, our data show that a brief TGF- β exposure can program a durable effect on T cells *in vivo*, as predicted for early memory T cells. In the two models used, TGF- β exposed T cells *ex vivo* had a significant impact on so-called “hard” end-points such as death from GVHD or anti-tumor responses. Globally, these results are supporting that the gain in Tcm brought by TGF- β exposure is sufficient to mediate clinically meaningful effects.

Our results are in line with other reports establishing a role for TGF- β in early memory T-cell differentiation and maintenance in mice (400, 474). In the field of human adoptive immunotherapy, a previous study done with tumor infiltrating lymphocytes (TILs) provides insights that overlap with some of our conclusions (475). In this context, exogenous TGF- β added to a rapid expansion procedure (REP) using feeder cells, anti-CD3 stimulation (OKT3) and IL-2 enhanced functional antigen-specific CD8⁺ T cells and prevented terminal CD8⁺ T-cell effector differentiation without leading to Treg expansion. Given that TILs are antigen-experienced T cells presenting evidence of exhaustion prior to expansion (476), which contrasts with the steady state peripheral T cells that we used, this previous work supports that the memory-promoting effects of TGF- β may be extended to several adoptive immunotherapy approaches. However, our results contrast with another study primarily done in mice that

reported that endogenous TGF- β signaling blockade in CD8⁺ T cells favored the expansion of Tcm cells relative to other subtypes (462). This is the reason why we tested paracrine TGF- β signaling blockade initially, which in contrast to the previous study, had opposite and marginal Tem promoting effects. Such discrepancy may pertain to differences in the inhibitor used and/or experimental conditions. We used enriched T cells (versus whole PBMC) and combined anti-CD3/CD28 stimulation (versus anti-CD3 alone), notably to reproduce the type of stimulation used in the CAR field. In addition, our results following repeated antigenic peptide loaded dendritic cell stimulations or culture using cytokine combinations corroborate the Tcm promoting effects of TGF- β in several experimental conditions. Nevertheless, our results may not apply to adoptive immunotherapy models in mice and optimizations may be required (concentration, timing of exposure, combination with other cytokines) before TGF- β supplementation is used in clinical-scale *ex vivo* T-cell manufacturing.

Our gene expression studies, along with the suppression of BLIMP-1 and over-expression of ID3 following TGF- β exposure are consistent with previous data contrasting effector versus memory signatures. These results linking TGF- β to the molecular underpinnings of early memory differentiation in human T cells are novel and extend our understanding of TGF- β and T-cell biology, but raise several questions. Future studies will be required to determine whether TGF- β mostly acts indirectly by mitigating T-cell activation signals or whether a more direct relationship exists between canonical or non-canonical TGF- β signaling and BLIMP-1 suppression (313, 375, 379). Moreover, we identified that two memory markers can be downregulated by TGF- β (modestly for CD27 and more robustly for *KLF2*). Although this had no functional consequences in our assays, it suggests that TGF- β may be explored to

confer specific properties to T cells. Notably, the previously described direct effect of TGF- β on *KLF2* expression during tissue resident-memory T-cell (Trm) differentiation may be harnessed for immunotherapy (253, 453).

There are significant implications of our findings for the field of T-cell immunotherapy. The programming of early memory T cells is desirable to ensure robust *in vivo* expansion, generation of effector T cells and self-renewal as early memory T cells leading to persistence of the infused cells (471). Likewise, the avoidance of Treg generation is paramount to the success of T-cell therapies. Our results show that the supplementation of TGF- β along with anti-CD3/CD28 stimulation can achieve this balance. Moreover, our results support that TGF- β operates according to the progressive T-cell differentiation model whereby *ex vivo* expanded early memory T cells originate from a pool of T cells that have not reached a Tem or Teff differentiation state. In addition to the targeted T-cell subsets preferentially leading to Tcm accumulation following TGF- β exposure, the activation of TGF- β signaling needs to be carefully timed. While TGF- β can be used to program early memory T cells during T-cell activation, it could also impede effector T cells function and survival within infected or neoplastic microenvironments (381, 399, 454, 477, 478). Our data support the notion that the TGF- β dependent acquisition of Tcm features during T-cell stimulation does not prevent the generation of potent T-cell responses *in vitro* or after transfer in NSG mice. A brief activation of the TGF- β pathway in T cells *in vitro* prior to adoptive transfer could harness the pro-memory properties of this master cytokine without compromising the therapeutic potential of the infused T cells.

Remerciements

The authors are grateful to the blood donors, the animal care facility personnel, Denis-Claude Roy and Vibuthi Dave for access to NSG mice, Martine Dupuis for expert flow cytometry support, Manuel Buscarlet and Lambert Busque for Next-generation sequencing, Sébastien Lemieux for advices regarding the bioinformatics analysis, Jana Gillies and Megan Levings for *FOXP3* promoter methylation studies as well as Nathalie Labrecque, Claude Perreault, Sylvie Lesage and Heather Melichar for helpful discussions and revision of the manuscript. J.S.D is a Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) scholar, a Cole Foundation Early Career Transition Award laureate and a ThéCell network as well as a Canadian Donation and Transplant Research Program member. This work was supported by the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada through a Discovery Grant (418607-2012-RGPIN) and by a Leukemia/Lymphoma Society of Canada (LLSC) operating grant (#202379), both held by J.S.D.

Références

1. Gattinoni, L., C. A. Klebanoff, and N. P. Restifo. 2012. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer* 12: 671-684.
2. Youngblood, B., J. S. Hale, H. T. Kissick, E. Ahn, X. Xu, A. Wieland, K. Araki, E. E. West, H. E. Ghoneim, Y. Fan, P. Dogra, C. W. Davis, B. T. Konieczny, R. Antia, X. Cheng, and R. Ahmed. 2017. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature* 552: 404-409.
3. Cieri, N., B. Camisa, F. Cocchiarella, M. Forcato, G. Oliveira, E. Provasi, A. Bondanza, C. Bordignon, J. Peccatori, F. Ciceri, M. T. Lupo-Stanghellini, F. Mavilio, A. Mondino, S. Biciato, A. Recchia, and C. Bonini. 2013. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood* 121: 573-584.
4. van der Waart, A. B., N. M. van de Weem, F. Maas, C. S. Kramer, M. G. Kester, J. H. Falkenburg, N. Schaap, J. H. Jansen, R. van der Voort, L. Gattinoni, W. Hobo, and H. Dolstra. 2014. Inhibition of Akt signaling promotes the generation of superior tumor-reactive T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* 124: 3490-3500.
5. Sukumar, M., J. Liu, Y. Ji, M. Subramanian, J. G. Crompton, Z. Yu, R. Roychoudhuri, D. C. Palmer, P. Muranski, E. D. Karoly, R. P. Mohny, C. A. Klebanoff, A. Lal, T. Finkel, N. P. Restifo, and L. Gattinoni. 2013. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest* 123: 4479-4488.
6. Pilipow, K., E. Scamardella, S. Puccio, S. Gautam, F. De Paoli, E. M. Mazza, G. De Simone, S. Polletti, M. Buccilli, V. Zanon, P. Di Lucia, M. Iannacone, L. Gattinoni, and E. Lugli. 2018. Antioxidant metabolism regulates CD8+ T memory stem cell formation and antitumor immunity. *JCI Insight* 3.
7. Orio, J., C. Carli, V. Janelle, M. Giroux, J. Taillefer, M. Goupil, M. Richaud, D. C. Roy, and J. S. Delisle. 2015. Early exposure to interleukin-21 limits rapidly generated anti-Epstein-Barr virus T-cell line differentiation. *Cytotherapy* 17: 496-508.
8. Gattinoni, L., X. S. Zhong, D. C. Palmer, Y. Ji, C. S. Hinrichs, Z. Yu, C. Wrzesinski, A. Boni, L. Cassard, L. M. Garvin, C. M. Paulos, P. Muranski, and N. P. Restifo. 2009. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med* 15: 808-813.
9. Carli, C., M. Giroux, and J. S. Delisle. 2012. Roles of Transforming Growth Factor-beta in Graft-versus-Host and Graft-versus-Tumor Effects. *Biol Blood Marrow Transplant* 18: 1329-1340.
10. Blank, U., and S. Karlsson. 2015. TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood* 125: 3542-3550.
11. Nakatsukasa, H., D. Zhang, T. Maruyama, H. Chen, K. Cui, M. Ishikawa, L. Deng, P. Zanvit, E. Tu, W. Jin, B. Abbatiello, N. Goldberg, Q. Chen, L. Sun, K. Zhao, and W. Chen. 2015. The DNA-binding inhibitor Id3 regulates IL-9 production in CD4(+) T cells. *Nat Immunol* 16: 1077-1084.
12. Li, M. O., Y. Y. Wan, and R. A. Flavell. 2007. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26: 579-591.
13. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
14. Dahmani, A., and J. S. Delisle. 2018. TGF-beta in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 10.
15. Ma, C., and N. Zhang. 2015. Transforming growth factor-beta signaling is constantly shaping memory T-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 11013-11017.

16. Filippi, C. M., A. E. Juedes, J. E. Oldham, E. Ling, L. Togher, Y. Peng, R. A. Flavell, and M. G. von Herrath. 2008. Transforming growth factor-beta suppresses the activation of CD8+ T-cells when naive but promotes their survival and function once antigen experienced: a two-faced impact on autoimmunity. *Diabetes* 57: 2684-2692.
17. Sanjabi, S., M. M. Mosaheb, and R. A. Flavell. 2009. Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity* 31: 131-144.
18. Chen, C. H., C. Seguin-Devaux, N. A. Burke, T. B. Oriss, S. C. Watkins, N. Clipstone, and A. Ray. 2003. Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J Exp Med* 197: 1689-1699.
19. Delisle, J. S., M. Giroux, G. Boucher, J. R. Landry, M. P. Hardy, S. Lemieux, R. G. Jones, B. T. Wilhelm, and C. Perreault. 2013. The TGF-beta-Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells. *Genes Immun* 14: 115-126.
20. Yang, C. Y., J. A. Best, J. Knell, E. Yang, A. D. Sheridan, A. K. Jesionek, H. S. Li, R. R. Rivera, K. C. Lind, L. M. D'Cruz, S. S. Watowich, C. Murre, and A. W. Goldrath. 2011. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat Immunol* 12: 1221-1229.
21. Ji, Y., Z. Pos, M. Rao, C. A. Klebanoff, Z. Yu, M. Sukumar, R. N. Reger, D. C. Palmer, Z. A. Borman, P. Muranski, E. Wang, D. S. Schrupp, F. M. Marincola, N. P. Restifo, and L. Gattinoni. 2011. Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 12: 1230-1237.
22. Petersen, M., M. Thorikay, M. Deckers, M. van Dinther, E. T. Grygielko, F. Gellibert, A. C. de Gouville, S. Huet, P. ten Dijke, and N. J. Laping. 2008. Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-beta type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney Int* 73: 705-715.
23. Janelle, V., C. Carli, J. Taillefer, J. Orio, and J. S. Delisle. 2015. Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *Journal of translational medicine* 13: 123.
24. Gudmundsdottir, H., A. D. Wells, and L. A. Turka. 1999. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 162: 5212-5223.
25. Hoeppli, R. E., K. N. MacDonald, P. Leclair, V. C. W. Fung, M. Mojibian, J. Gillies, S. M. R. Rahavi, A. I. M. Campbell, S. K. Gandhi, A. M. Pesenacker, G. Reid, C. J. Lim, and M. K. Levings. 2019. Tailoring the homing capacity of human Tregs for directed migration to sites of Th1-inflammation or intestinal regions. *Am J Transplant* 19: 62-76.
26. Helsen, C. W., J. A. Hammill, V. W. C. Lau, K. A. Mwawasi, A. Afsahi, K. Bezverbnaya, L. Newhook, D. L. Hayes, C. Aarts, B. Bojovic, G. F. Denisova, J. M. Kwiecien, I. Brain, H. Derocher, K. Milne, B. H. Nelson, and J. L. Bramson. 2018. The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity. *Nat Commun* 9: 3049.
27. Rabinovich, B. A., Y. Ye, T. Etto, J. Q. Chen, H. I. Levitsky, W. W. Overwijk, L. J. Cooper, J. Gelovani, and P. Hwu. 2008. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14342-14346.
28. Takai, S., J. Schlom, J. Tucker, K. Y. Tsang, and J. W. Greiner. 2013. Inhibition of TGF-beta1 signaling promotes central memory T cell differentiation. *J Immunol* 191: 2299-2307.
29. Icheva, V., S. Kayser, D. Wolff, S. Tuve, C. Kyzirakos, W. Bethge, J. Greil, M. H. Albert, W. Schwinger, M. Nathrath, M. Schumm, S. Stevanovic, R. Handgretinger, P. Lang, and T. Feuchtinger. 2013. Adoptive transfer of epstein-barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific t

- cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 31: 39-48.
30. Lin, R., L. Chen, G. Chen, C. Hu, S. Jiang, J. Sevilla, Y. Wan, J. H. Sampson, B. Zhu, and Q. J. Li. 2014. Targeting miR-23a in CD8+ cytotoxic T lymphocytes prevents tumor-dependent immunosuppression. *J Clin Invest* 124: 5352-5367.
 31. Benevides, L., R. S. Costa, L. A. Tavares, M. Russo, G. A. Martins, L. L. P. da Silva, P. A. L. Karla de, F. Q. Cunha, V. Carregaro, and J. S. Silva. 2018. Blimp-1 controls Th9 cell development, IL-9 production and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*.
 32. Cimmino, L., G. A. Martins, J. Liao, E. Magnusdottir, G. Grunig, R. K. Perez, and K. L. Calame. 2008. Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *J Immunol* 181: 2338-2347.
 33. Thomas, D. A., and J. Massague. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8: 369-380.
 34. Kim, M. V., W. Ouyang, W. Liao, M. Q. Zhang, and M. O. Li. 2013. The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8+ T cell responses to infection. *Immunity* 39: 286-297.
 35. Crompton, J. G., M. Sukumar, and N. P. Restifo. 2014. Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy. *Immunol Rev* 257: 264-276.
 36. Das, L., and A. D. Levine. 2008. TGF-beta inhibits IL-2 production and promotes cell cycle arrest in TCR-activated effector/memory T cells in the presence of sustained TCR signal transduction. *J Immunol* 180: 1490-1498.
 37. Li, M. O., and R. A. Flavell. 2008. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134: 392-404.
 38. Tran, D. Q., H. Ramsey, and E. M. Shevach. 2007. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 110: 2983-2990.
 39. Schmidt, A., M. Eriksson, M. M. Shang, H. Weyd, and J. Tegner. 2016. Comparative Analysis of Protocols to Induce Human CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells by Combinations of IL-2, TGF-beta, Retinoic Acid, Rapamycin and Butyrate. *PLoS One* 11: e0148474.
 40. McMurphy, A. N., J. Gillies, M. C. Gizzi, M. Riba, J. M. Garcia-Manteiga, D. Cittaro, D. Lazarevic, S. Di Nunzio, I. S. Piras, A. Bulfone, M. G. Roncarolo, E. Stupka, R. Bacchetta, and M. K. Levings. 2013. A novel function for FOXP3 in humans: intrinsic regulation of conventional T cells. *Blood* 121: 1265-1275.
 41. Graef, P., V. R. Buchholz, C. Stemberger, M. Flossdorf, L. Henkel, M. Schiemann, I. Drexler, T. Hofer, S. R. Riddell, and D. H. Busch. 2014. Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells. *Immunity* 41: 116-126.
 42. Xu, Y., M. Zhang, C. A. Ramos, A. Durett, E. Liu, O. Dakhova, H. Liu, C. J. Creighton, A. P. Gee, H. E. Heslop, C. M. Rooney, B. Savoldo, and G. Dotti. 2014. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood* 123: 3750-3759.
 43. Boussiotis, V. A., Z. M. Chen, J. C. Zeller, W. J. Murphy, A. Berezovskaya, S. Narula, M. G. Roncarolo, and B. R. Blazar. 2001. Altered T-cell receptor + CD28-mediated signaling and blocked cell cycle progression in interleukin 10 and transforming growth factor-beta-treated alloreactive T cells that do not induce graft-versus-host disease. *Blood* 97: 565-571.
 44. Delisle, J. S., M. Giroux, G. Boucher, J. R. Landry, M. P. Hardy, S. Lemieux, R. G. Jones, B. T. Wilhelm, and C. Perreault. 2013. The TGF-beta-Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells. *Genes Immun*.

45. Ishigame, H., M. M. Mosaheb, S. Sanjabi, and R. A. Flavell. 2013. Truncated form of TGF-betaRII, but not its absence, induces memory CD8+ T cell expansion and lymphoproliferative disorder in mice. *J Immunol* 190: 6340-6350.
46. Liu, S., T. Etto, T. Rodriguez-Cruz, Y. Li, C. Wu, O. J. Fulbright, P. Hwu, L. Radvanyi, and G. Lizee. 2010. TGF-beta1 induces preferential rapid expansion and persistence of tumor antigen-specific CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 33: 371-381.
47. Gros, A., P. F. Robbins, X. Yao, Y. F. Li, S. Turcotte, E. Tran, J. R. Wunderlich, A. Mixon, S. Farid, M. E. Dudley, K. Hanada, J. R. Almeida, S. Darko, D. C. Douek, J. C. Yang, and S. A. Rosenberg. 2014. PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* 124: 2246-2259.
48. Skon, C. N., J. Y. Lee, K. G. Anderson, D. Masopust, K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 2013. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 14: 1285-1293.
49. Yang, L., Y. Pang, and H. L. Moses. 2010. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31: 220-227.
50. Bollard, C. M., C. Rossig, M. J. Calonge, M. H. Huls, H. J. Wagner, J. Massague, M. K. Brenner, H. E. Heslop, and C. M. Rooney. 2002. Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood* 99: 3179-3187.

Légendes de Figures

Figure 1. Exposure to exogenous TGF- β favors Tcm marker expression in activated human T cells. (A). Representative staining of CD4⁺ T-cell differentiation on day 7 of culture based on the expression of CD45RO and CD62L or CCR7 markers. (B). Percentages (data points for each donor and average represented by histograms) of T-cell subpopulations measured on CD4⁺ or CD8⁺ T cells on day 7 and 14 of culture: Tcm, CD62L⁺CD45RO⁺; Tem, CD62L⁻CD45RO⁺. (C). Percentage of CCR7 expressing CD4⁺ and CD8⁺ T cells on day 7 and 14 of culture. (\emptyset , no added TGF- β ; square, TGF- β supplementation; triangle, GW788388 addition) (7-10 different donors). (D). Tcm and Tem profiles of sorted naïve and (E). bulk memory CD4 and CD8 T cells after 7 days of anti-CD3/CD28 stimulation and TGF- β signaling modulation (6 donors). Error bars represent the standard error of the mean (SEM). All comparisons are with the reference condition. *P< 0.05, **P< 0.01.

Figure 2. TGF- β confers an early memory gene expression signature to ex vivo stimulated T cells. (A). *PRDMI* and (B). *ID3* transcript levels by quantitative PCR performed at 72hrs of culture (4 donors). Data expressed as fold change expression in TGF- β exposed cells relative to the reference condition (no added TGF- β , \emptyset) set at 1. (C). One representative western blot analysis performed on stimulated T cells at 72 hours and 7 days and (D). compiled densitometric analyses of ID3 and BLIMP1 protein levels at 72hrs in T cells activated in the absence or presence of TGF- β (3 different donors, reference condition set at 1). (E). Gene-expression analyses in sorted CD4⁺ and CD8⁺ T cells after 7 days of culture in

the presence or absence of TGF- β (4 donors). Data represented as differential expression (log₂) of indicated transcripts in TGF- β exposed T cells relative to the reference condition (no exogenous TGF- β), arbitrarily set at 0. Transcripts included were at least differentially expressed 1.5-fold and statistically significant between the two conditions in either CD4⁺ or CD8⁺ T cells as calculated on normalized data (DESeq2). Histograms represent means and error bars SEM variations. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 3. TGF- β -mediated increased in Tcm is independent of T-cell expansion and apoptosis. (A). Cell count at 3, 7 and 14 days of culture, initiated with 1x10⁵ T cells and (B). proportion of CD4 and CD8 T cells at 7 and 14 days of culture (10 different donors) following anti-CD3/CD28 stimulation in the presence or absence (\emptyset) of TGF- β . (C). Representative cell trace violet (CTV) dilution plots on CD4⁺ T cells and (D). compiled data from 3 donors showing equivalent proportion of proliferating cells across conditions for both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. (E). T cell viability assessed by flow cytometry using annexinV (AV) and propidium iodide (PI) staining at day 7 and 14 of culture. Dead and apoptotic cells include AV⁻PI⁺, AV⁺PI⁺ and AV⁺PI⁻ T cells. Live cells include AV⁻PI⁻ T cells (3-4 different donors).

Figure 4. TGF- β exposure favors polyfunctional cytokine secretion by *ex vivo* stimulated T cells. (A) Representative staining of intracellular IL-2, TNF- α and IFN- γ in T cells in stimulated with PMA/Ionomycin (PMA/IONO) or unstimulated (\emptyset PMA/IONO) after 7 of 14 days in culture. Numbers in the dot plots indicate the percentage of expressing cells. (B). Ratio of cytokine expressing CD4⁺ and CD8⁺ T cells across experimental conditions at day 7

and 14 of culture (normalized to the reference condition – no added TGF- β , \emptyset) in four different donors. (C) Representative gating for the isolation of polyfunctional T cells and (D), compiled results in 4 donors. *P< 0.05, Error bars represent SEM variation.

Figure 5. TGF- β exposure during T-cell activation does not induce regulatory T-cell differentiation. (A). Differential *FOXP3*, *IKZF2* (coding for HELIOS), *IKZF4* (Coding for EOS) expression (log2) in sorted CD4⁺ and CD8⁺ T cells after 7 days of culture in the presence or absence of TGF- β (4 donors) and represented as differential expression of transcript levels in TGF- β exposed T cells relative to the reference condition (no exogenous TGF- β), arbitrarily set at 0. (B) Representative FOXP3 expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells using intracellular flow cytometry and compiled data at day 7 and 14 on both CD4⁺ and CD8⁺ FOXP3-expressing T cells (4 donors). (C) Regulatory T cell-specific demethylation region (TSDR) pyrosequencing analysis results shown following analysis of the nine CpG sites within the TSDR region located from -2330 to -2263 base pairs upstream of the transcriptional start codon (ATG) of *FOXP3* on peripheral blood sorted Tregs (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻, pTreg), sorted CD4⁺ after 7 days of anti-CD3/CD28 stimulation in presence of TGF- β (5ng/ml) and/or IL-2 (100U/ml) and total T cells from day 7 and 14 of culture (4 donors). (D). Representative dot plots showing CTV-dilution of responder T cells 6 days following stimulation with irradiated allogeneic PBMC. Autologous unlabelled sorted pTreg, autologous unstimulated T cells or day 7 stimulated T cells (in the absence – \emptyset - or presence of TGF- β) were added to the culture on the first day. (E). Mean percentage of proliferating cells relative to the pTreg condition (set at 1) from 3 different donors at a 8:1 “suppressor”: responder ratios. (F). Cytokine levels in the supernatants of unstimulated or anti-CD3/CD28 stimulated T

cell culture in the presence or absence of TGF- β , harvested at day 7 of culture. *P< 0.05, **p<0.01. Error bars represent SEM variation.

Figure 6. TGF- β exposure confers an enhanced capacity to expand, persist and mediate xenoreactivity after adoptive transfer in immunodeficient mice. (A). Representative dot plots of mouse peripheral blood at various time points, and (B) in the spleen at day 28 after adoptive transfer of T cells stimulated with anti-CD3/CD28 for 7 days in the presence (TGF- β) or absence (\emptyset) of TGF- β . Numbers in dot plots indicate the percentage of events in the human CD4 (hCD4) and human CD8 (hCD8) gates. (C) Mean percentage of human T cells in the peripheral blood and spleen at day 28 after adoptive transfer (8 mice per group, 3 different donors). (D) Variation in mouse weight over time after adoptive transfer. *P< 0.05, ***P< 0.001 unpaired t-test. Error bars represent SEM variations.

Figure 7. CAR T cells exposed to TGF- β *ex vivo* are superior to control tumor growth *in vivo*. (A). Representative staining showing specific lysis of BCMA-expressing targets. Numbers on dot plots refer to percentages of cells in the gates (CTV, cell tracer violet. CTY, cell tracer yellow). (B). Compilation of 4 experiments with different donors showing equivalent lytic potential of TGF- β exposed and unexposed CART-BCMA at multiple target:effector ratios. (C). Serial bioluminescence imaging (ventral view) of luciferase expressing KMS-11 cells starting 7 days after intravenous injection, on the day of adoptive transfer (day 0). Data acquired over two experiments (total of 7-8 mice per group receiving CART-BCMA previously exposed or unexposed to TGF- β). Mice inoculated with tumor cells but that did not receive CART-BCMA were used as controls of tumor growth (No CART

cells). (D). Compiled ventral and dorsal luciferase output at day 35 between the two experimental groups and (E). Count of CART-BCMA T cells previously exposed or not (\emptyset) to TGF- β (as assessed by CD271 expression) gated on human CD3⁺ cells, acquired using constant acquisition time from 100 μ l of peripheral blood at indicated days after adoptive transfer. *P < 0.05, ***P < 0.001. Error bars represent SEM variations.

Figure 1

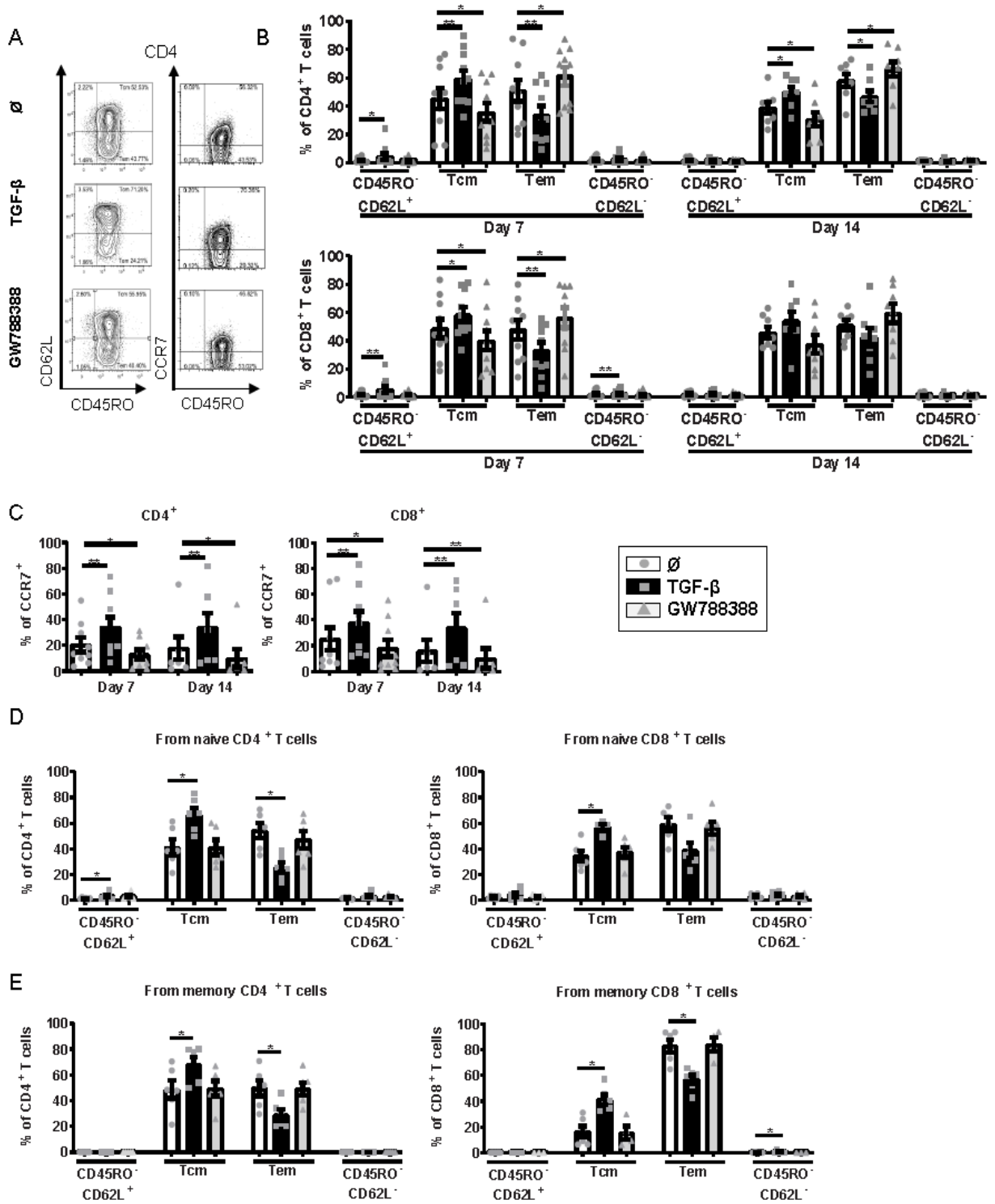


Figure 2

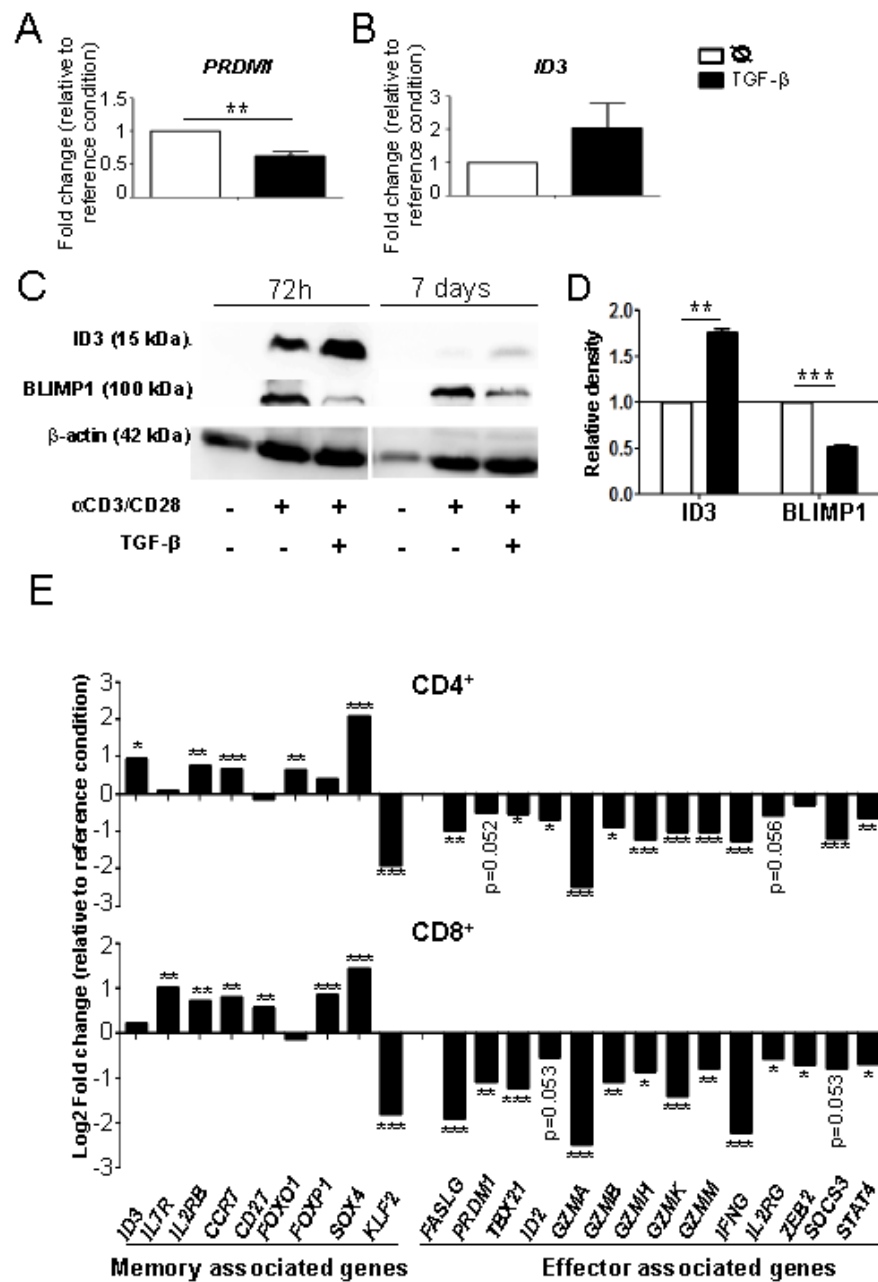


Figure 3

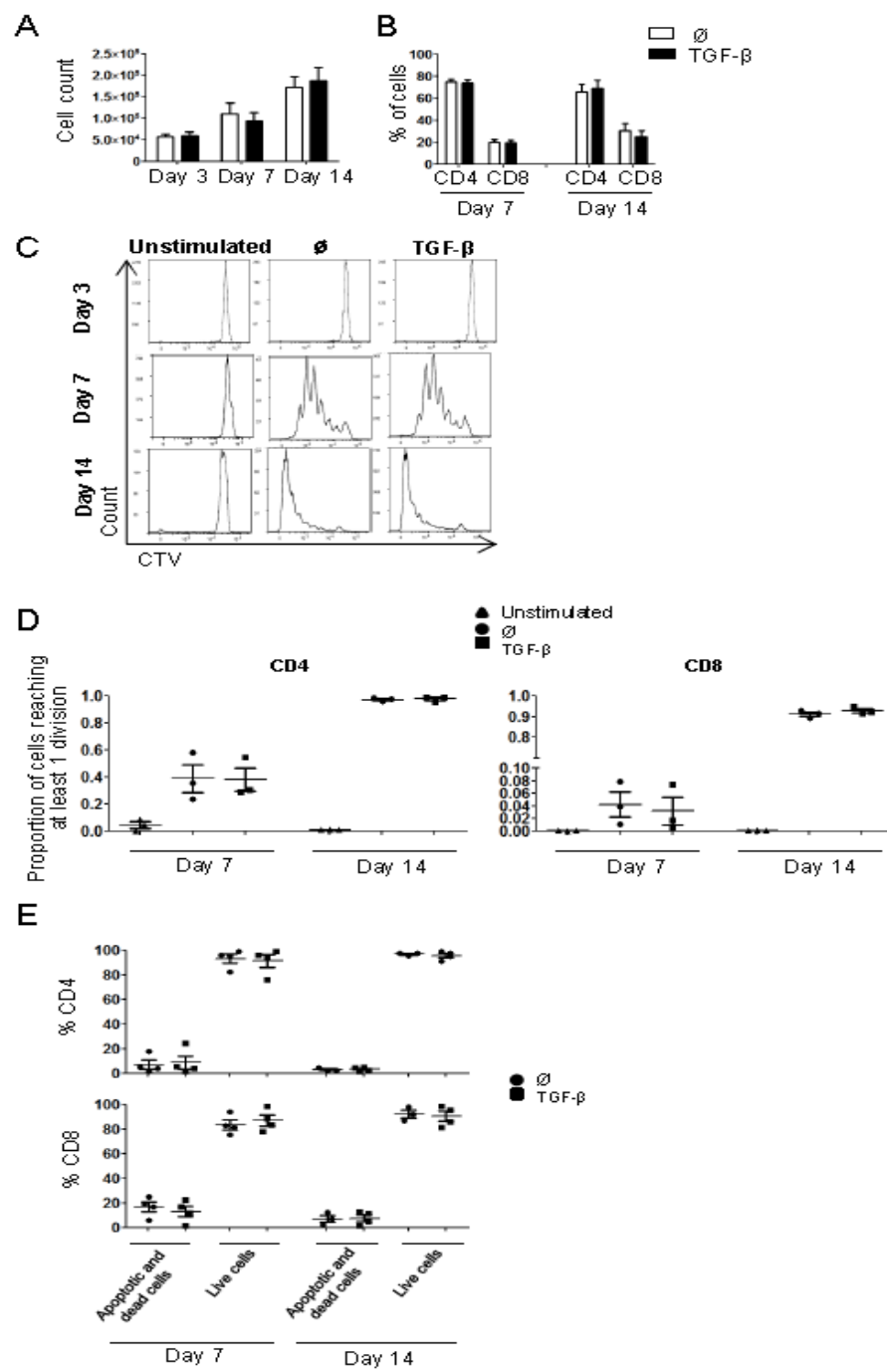


Figure 4

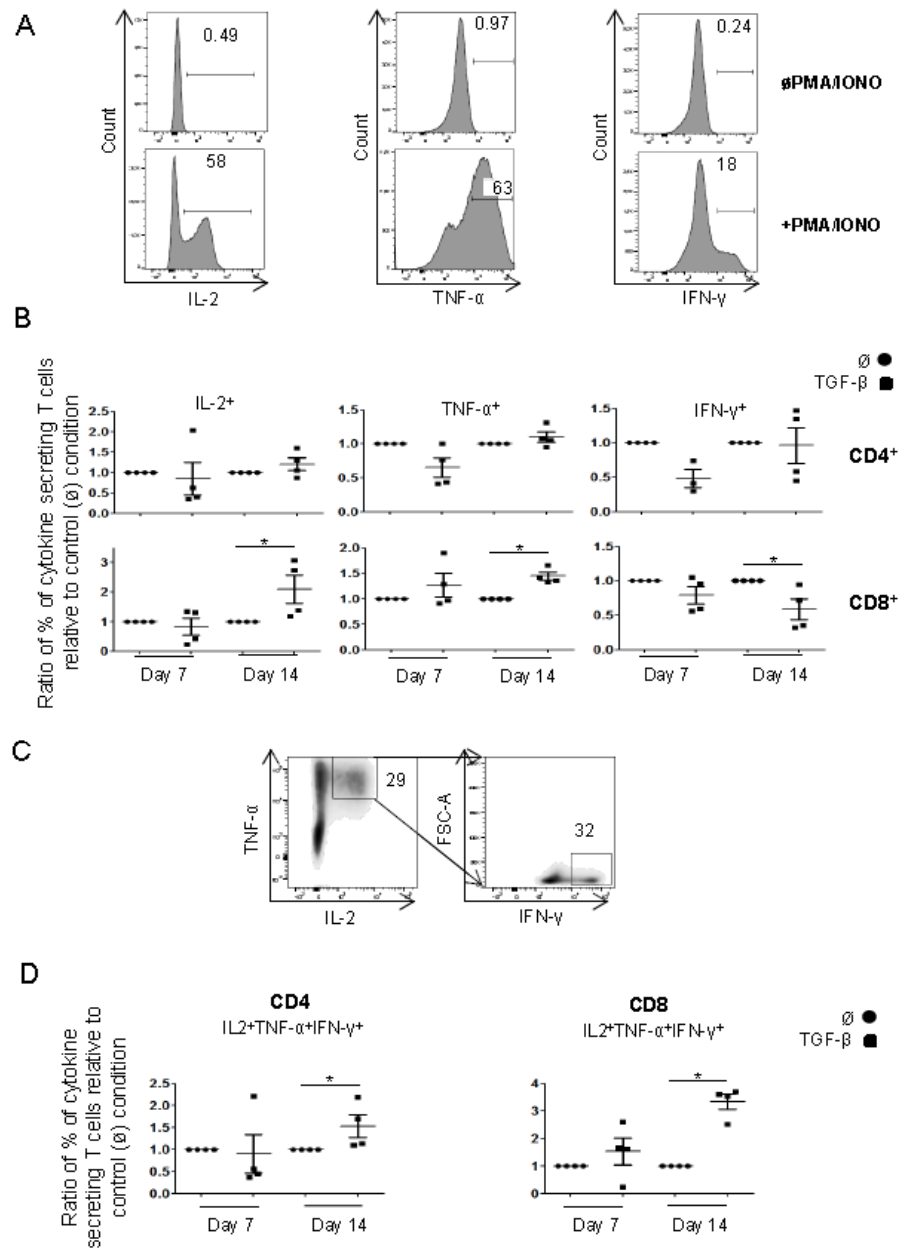


Figure 5

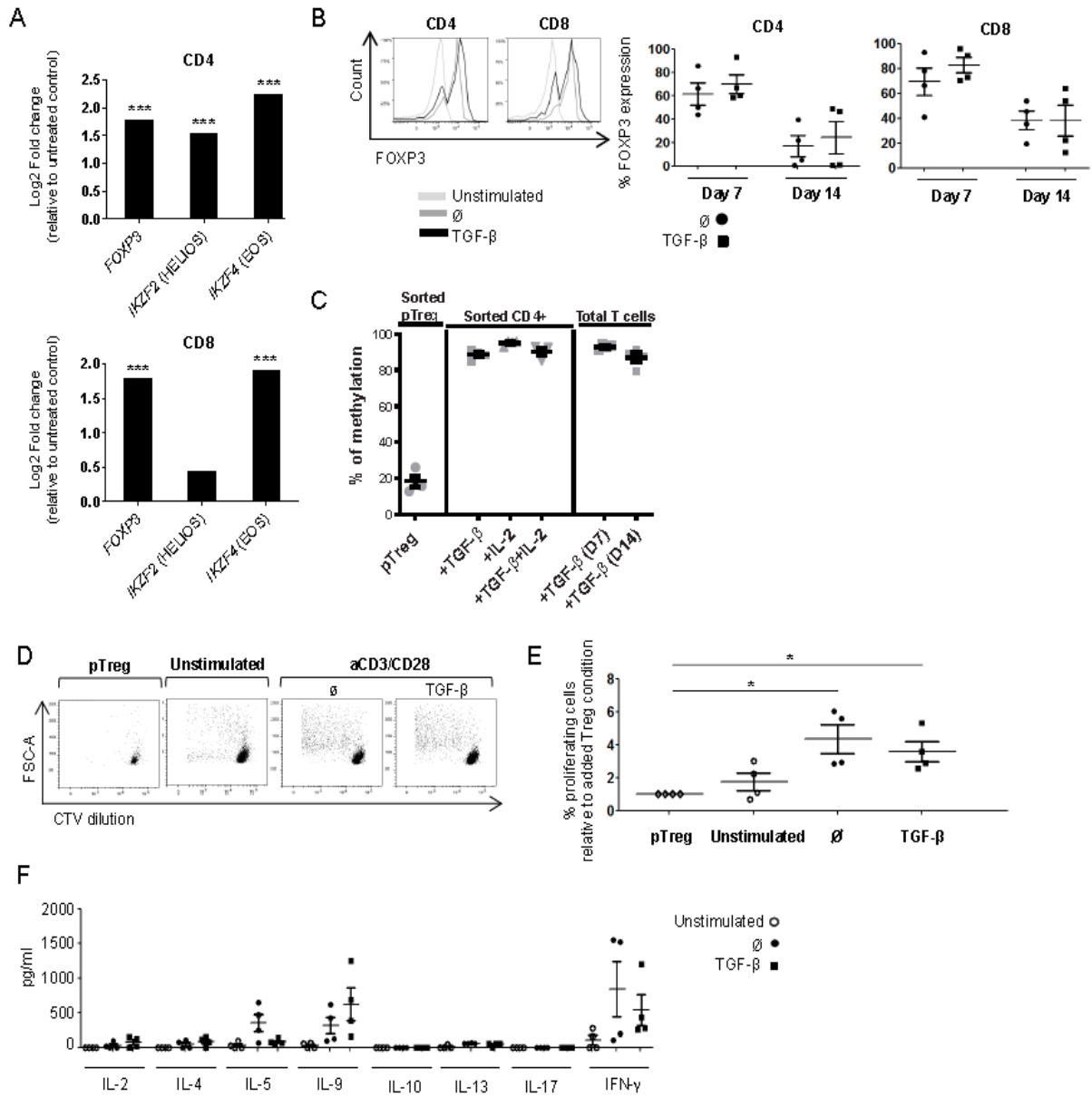


Figure 6

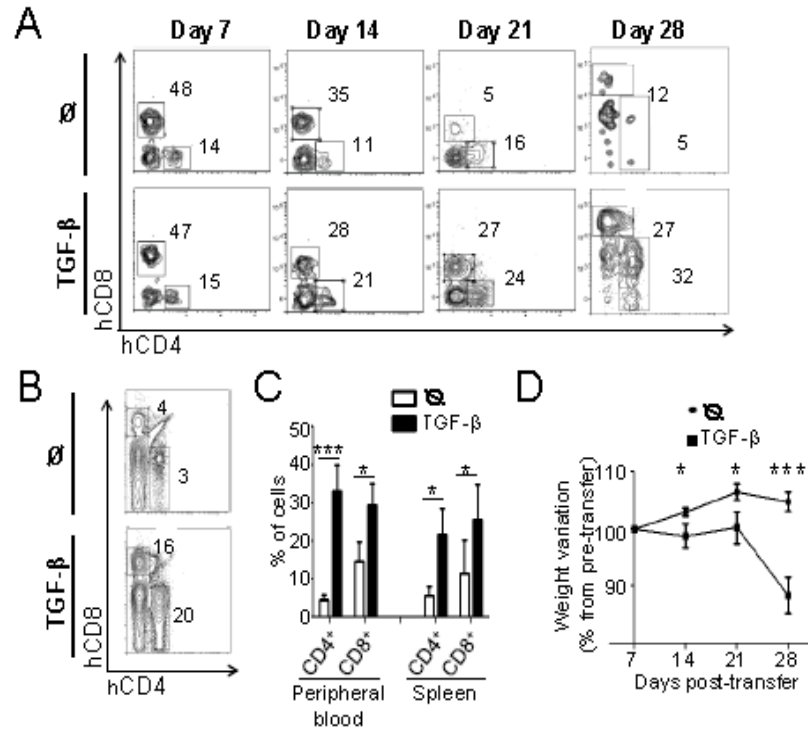


Figure 7

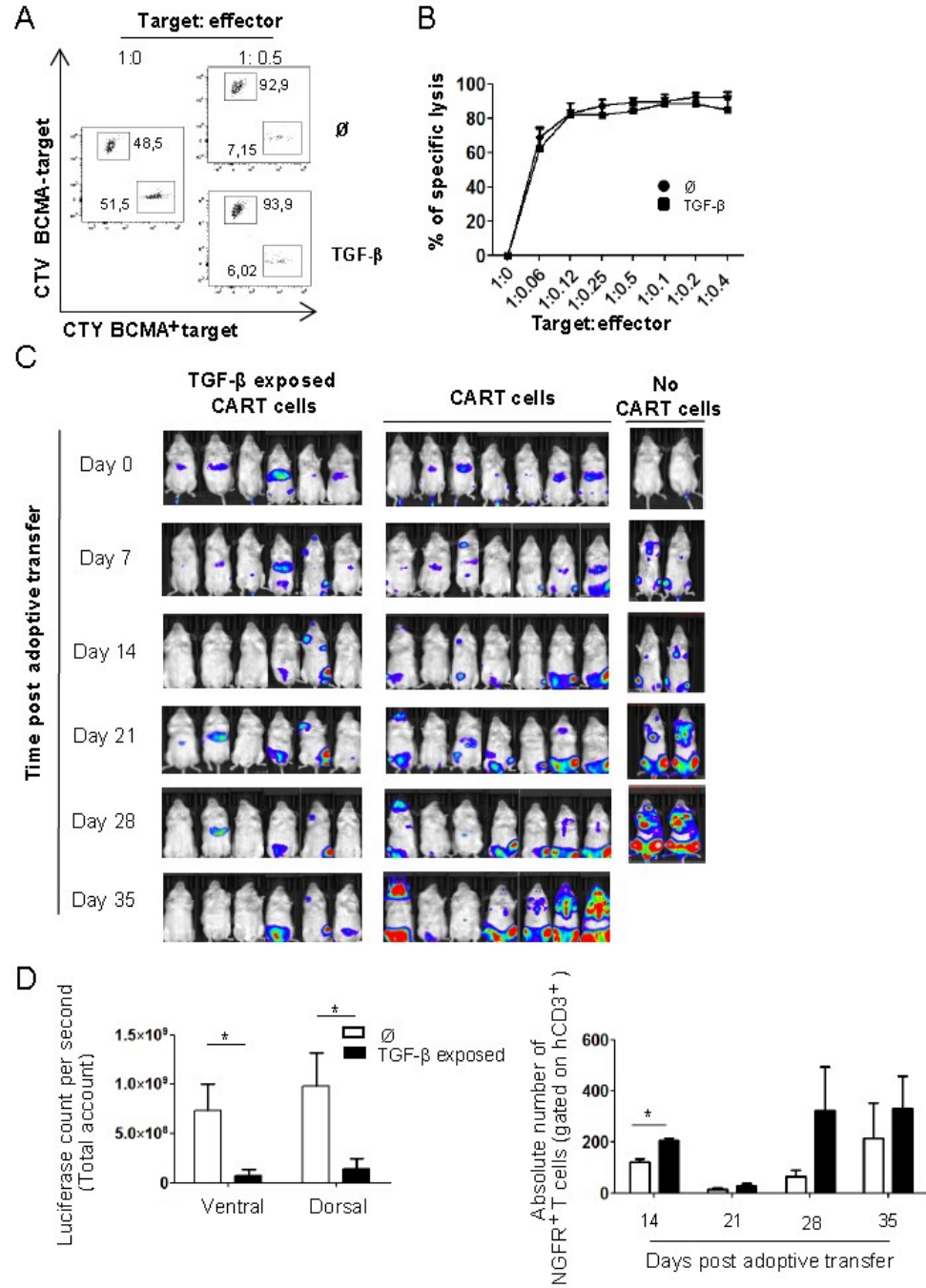
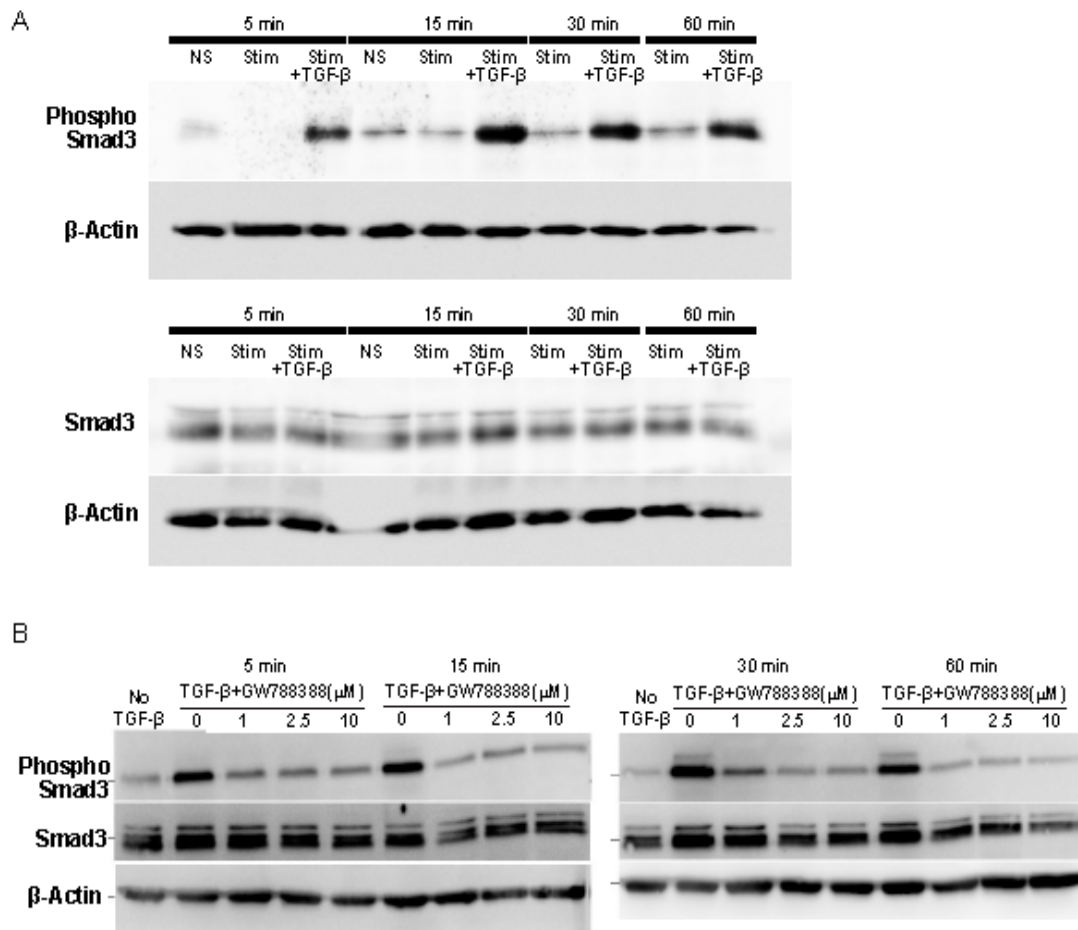
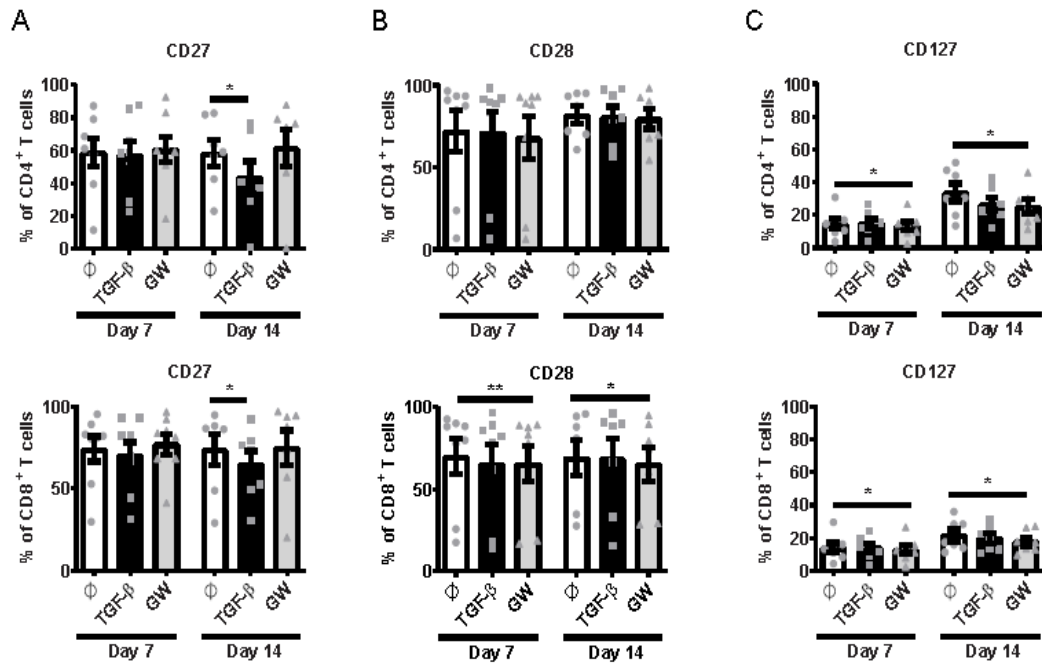


Figure S1



Supplementary Figure S1. TGF- β exposure during T-cell activation leads to SMAD3 phosphorylation and GW788388 inhibits TGF- β mediated SMAD3 phosphorylation. (A). Western blots obtained from two gels run in parallel from the same experiment (one representative of 4 different donors) for activated phospho-SMAD3 and total SMAD3. NS: non-stimulated, Stim: Stimulated with anti-CD3/CD28 +/- TGF- β (5ng/ml) at the indicated time points (min: minutes) after stimulation. Stimulation was performed culture media by adding TGF- β (5ng/ml), soluble anti-CD3 (OKT3, eBioscience) and anti-CD28, followed by cross-linking with a goat anti-mouse antibody (Invitrogen, catalog # 31160). Cells were collected at the indicated times after cross-linking. (B). Steady state T cells submitted to TGF- β (5ng/ml) and different concentrations of GW788388 at the indicated time-points. One representative of two donors.

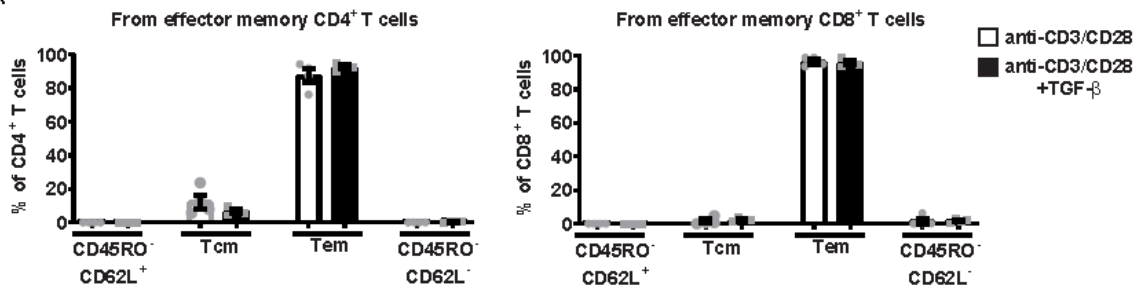
Figure S2



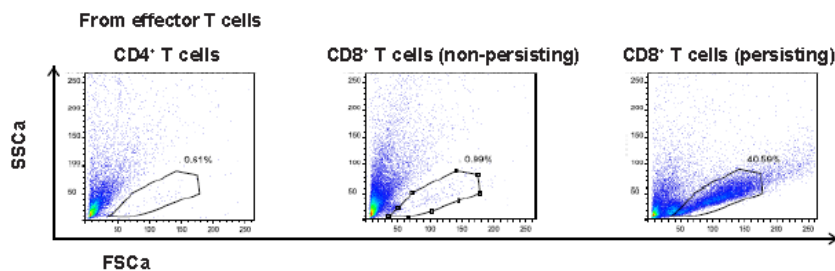
Supplementary Figure S2. Additional phenotypic features. (A). Percentage of CD27, (B). CD28 and (C). CD127-expressing T cells at day 7 and 14 of culture following anti-CD3/CD28 stimulation. 7 to 8 different donors, represented individually and by the mean. Experimental conditions (TGF- β supplementation and GW788388 treatment) were compared to the control condition (\emptyset , no added TGF- β or GW788388). Error bars represent SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure S3

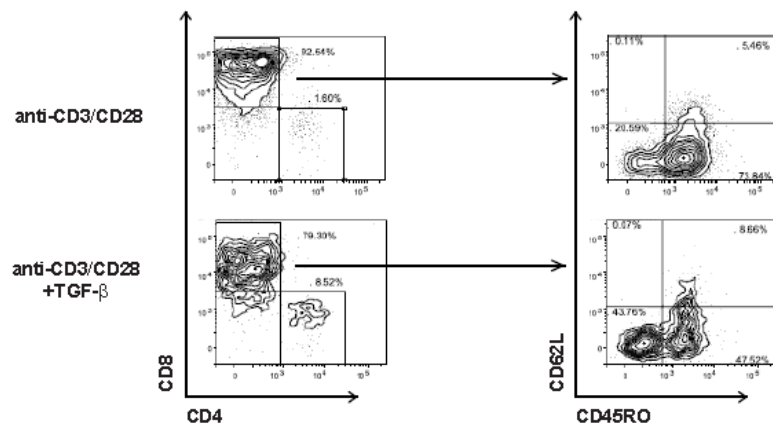
A



B

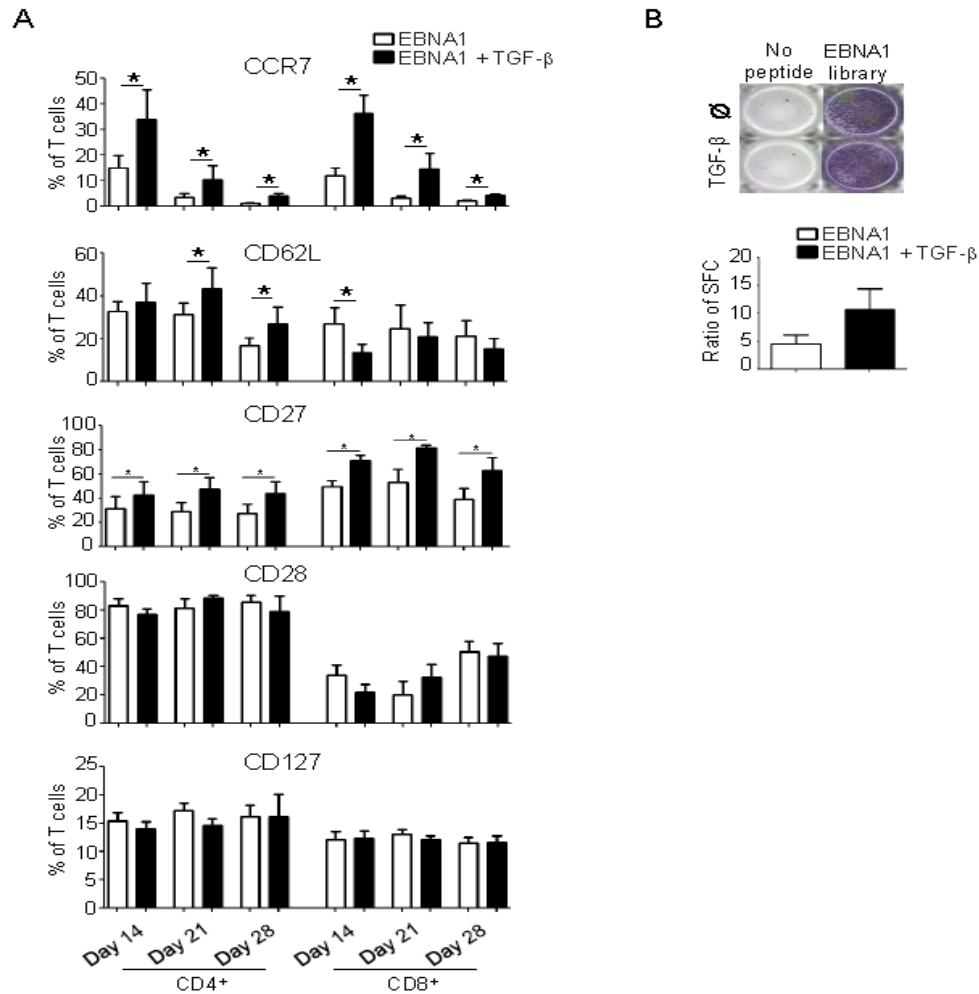


C



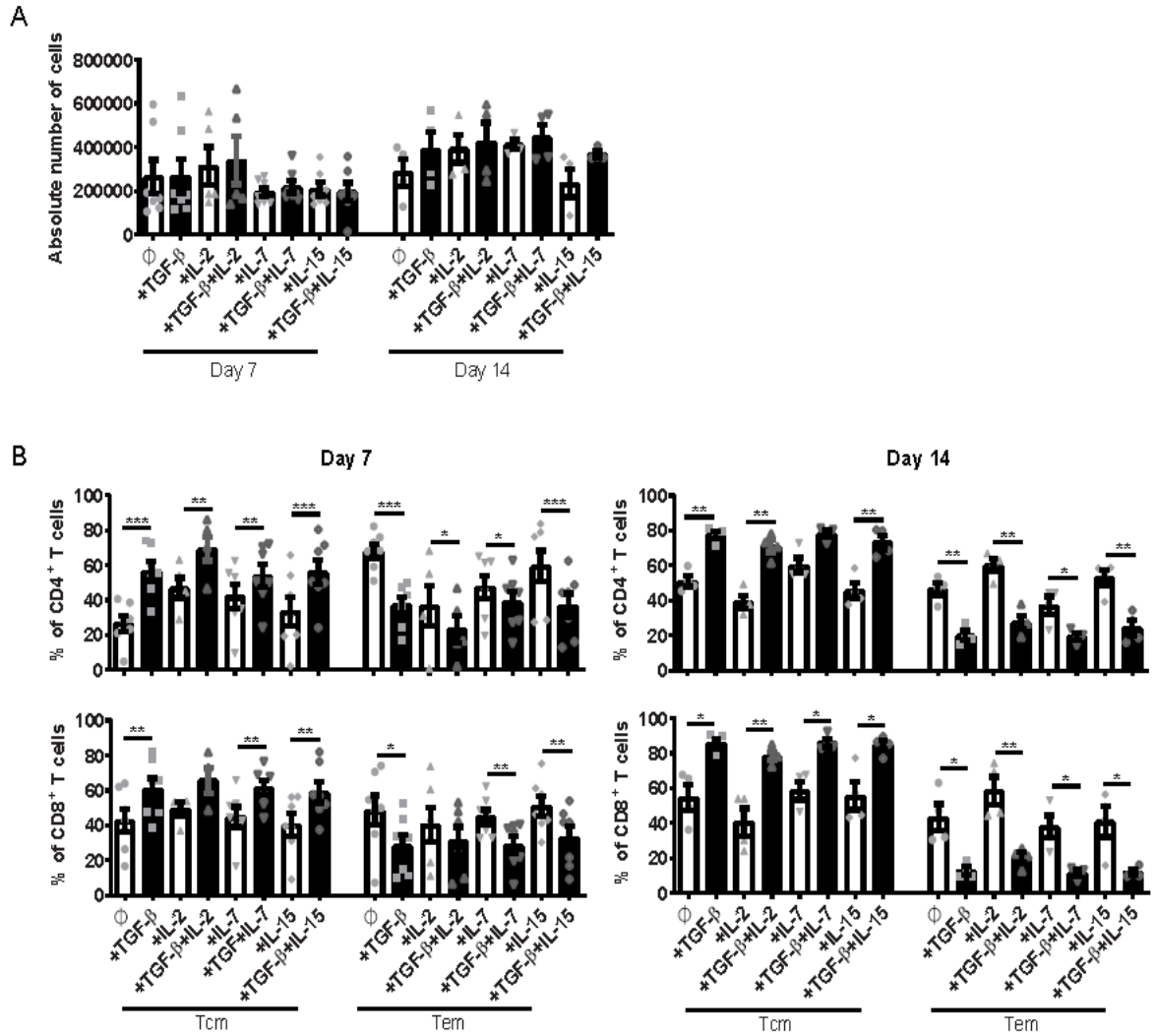
Supplementary Figure S3. Ex vivo stimulated Tem and Teff do not revert to Tcm. (A). Data compiled from 4 different donors. Sorted CD4⁺ or CD8⁺ effector memory T cells (Tem) were restimulated with anti-CD3/CD28 in the presence (black) or absence (white) of TGF- β for 7 days and re-assessed for CD45RO and CD62L expression. Data points are represented, along with the mean (histogram) and SEM. (B). Representative dot plots from similarly sorted and stimulated effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Teff) showing that CD4⁺ Teff failed to persist in culture (4/4 donors) and that CD8⁺ Teff from only a fraction (2/4 donors) could be analyzed after 7 days in culture. The lymphoid gate is shown according to Forward (FSC) and Side scatter (SSC) in the control condition (anti-CD3/CD28 stimulation alone). (C). Persisting/expanded CD8⁺ T cells in 2/4 donors either kept a phenotype compatible with Teff (CD45RO⁻ CD62L⁻) or Tem (CD45RO⁺ CD62L⁻) in both control and TGF- β conditions.

Figure S4



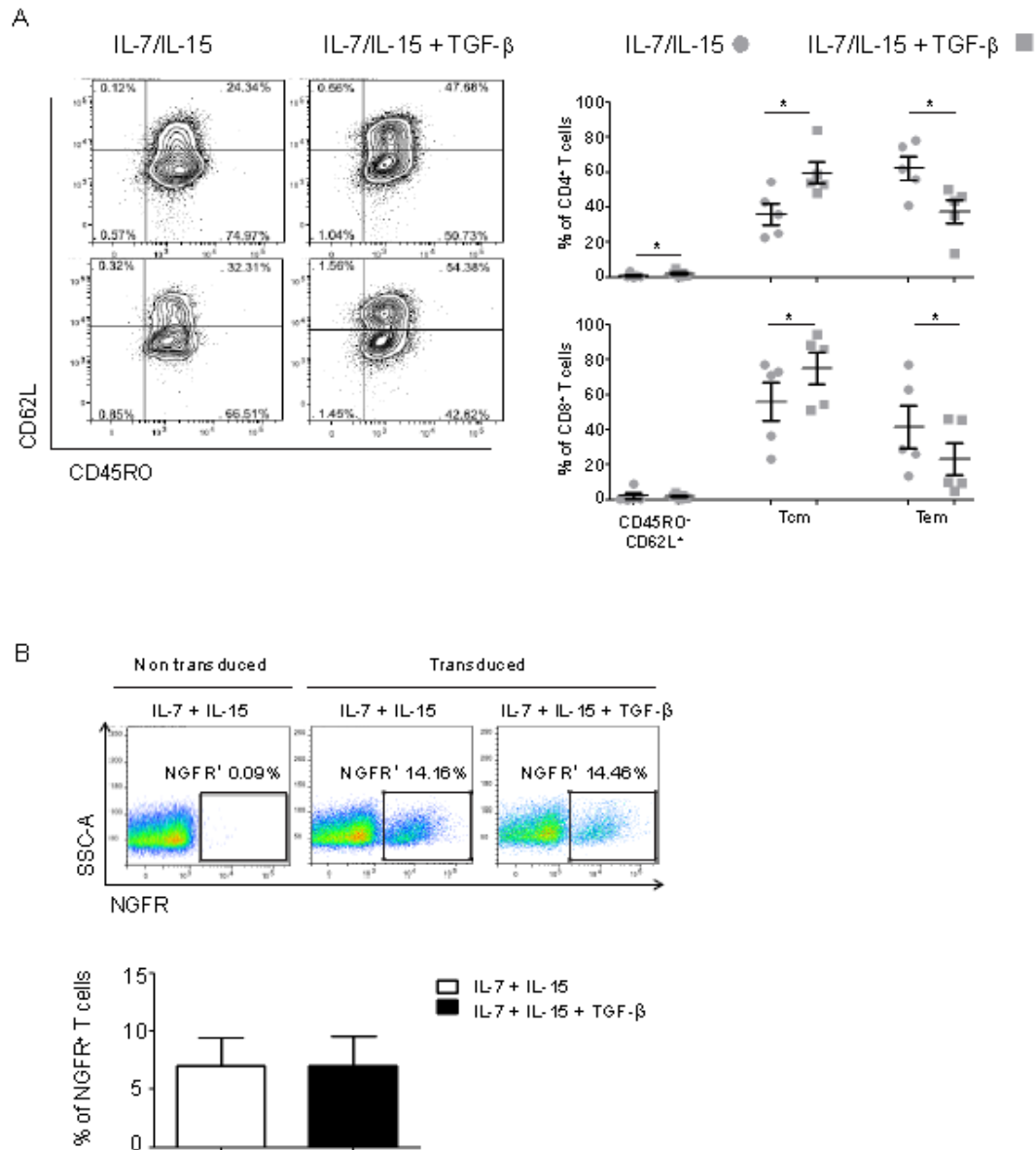
Supplementary Figure S4. TGF- β imparts Tcm features to T-cell lines targeting clinically relevant antigens. (A). Percentage of CCR7, CD62L, CD27, CD28 and CD127 expressing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in EBNA1-specific T cell lines at day 14, 21 and 28 of culture (mean of 5 different donors) following TGF- β exposure, or not, during the first 14 days of culture only. T cells were stimulated with EBNA1 peptide loaded on autologous dendritic cells weekly from day 0 onward. (B). Representative IFN- γ ELISPOT at the end of the culture (day 28) using 1×10^5 cells stimulated with EBNA1 peptide library or diluent as control (no peptide) and compiled ratios of spot forming cells (SFC) between test and no peptide control condition (N=5). *P< 0.05. Error bars represent SEM variation.

Figure S5



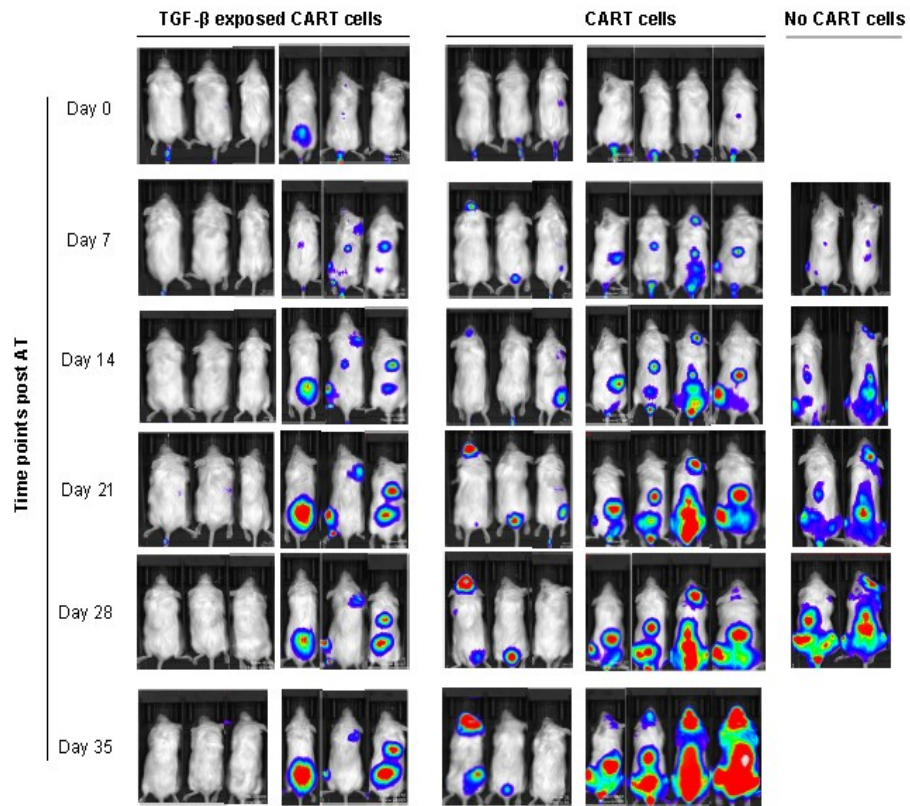
Supplementary Figure S5. TGF- β does not restrict T-cell growth in short term cultures and maintains Tcm skewing properties when combined with other cytokines. (A). Cell counts after 7 and 14 days of culture in the presence of the indicated cytokines (\emptyset : reference condition, no added cytokines). (B). Tcm or Tem marker expression at day 7 and 14 of culture in the presence of the indicated cytokines. Individual data points are represented (7 donors for day 7, 4 donors for day 14), along with histograms indicating the mean and error bars indicating SEM. Comparisons are made to assess for the impact of adding TGF- β to all the individual conditions. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure S6



Supplementary Figure S6. TGF- β enhances Tcm differentiation when combined with IL-7 and IL-15 and does not alter T-cell transduction efficiency. (A). Representative dot plots of Tcm (top right quadrant) and Tem (bottom right quadrant) after anti-CD3/CD28 stimulation (day 7) in the indicated conditions (IL-7/IL-15 +/- TGF- β) and compilation from 5 different donors. (B). Representative dot plots and compilation from 4 donors showing transduction efficiency obtained after a 7-day expansion culture using anti-CD3/CD28 stimulation and IL-7/IL-15. Transduced T cells are identified by the expression of low-affinity nerve growth factor receptor (NGFR, CD271) expression. SSC, side scatter. Error bars represent SEM. * $p < 0.05$

Figure S7



Supplementary Figure 7. Dorsal views of KMS-11 injected mice following CART-BCMA injection. Complementary images from Figure 7 mice showing luminescence as captured from the dorsal view.

2. Evaluer le potentiel du TGF- β à améliorer la migration et la rétention des LT-OT-I stimulés *ex-vivo* vers le site de la tumeur, dans un modèle murin de carcinome pulmonaire exprimant le peptide OVA (Lewis Lung Carcinoma-LLC-OVA)

2.1 Mise en contexte

La migration, l'infiltration et la rétention au site tumoral des lymphocytes T stimulés *ex vivo* et injectés restent un défi important en immunothérapie adoptive. Le TGF- β est un architecte important de la différenciation des lymphocytes T en cellules résidentes-mémoires (*resident memory*-Trm), notamment via l'expression de l'intégrine CD103, dont les caractéristiques ressemblent aux lymphocytes T qui infiltrent les tumeurs (*tumor infiltrating lymphocytes* – TILs) et dont l'abondance corrèle avec de meilleures survies dans bien des types de cancer. Nous avons émis l'hypothèse qu'une exposition brève au TGF- β stimulerait chez les lymphocytes T activés *ex-vivo* l'acquisition de caractéristiques, favorisant la migration et la rétention au site tumoral dans un modèle murin bien connu et que des cellules T humaines exposées au TGF- β seraient aussi en mesure d'adopter des caractéristiques de Trm. Nos données indiquent qu'une exposition au TGF- β avant l'infusion des T *in vivo* favorise l'expression de CD103 et du récepteur à chimiokine CXCR3, menant à une meilleure migration en présence de CXCL9, 10 et 11 et une meilleure infiltration tumorale. Les cellules pré-traitées au TGF- β étaient aussi légèrement plus efficaces pour freiner la croissance tumorale que des cellules non-exposées. Chez l'humain, le TGF- β induit l'expression de

CD103 et d'un programme d'expression génique semblable, mais avec plusieurs différences notables, aux Trm.

2.2 Matériel et méthodes:

Animaux et modèle tumoral:

Les souris C57BL/6 (B6) et OT-IB6.SJLRag1^{-/-} (OT-IB6SJL) ont été élevées au Centre de Recherche Hospitalier Maisonneuve-Rosemont. Les souris ont été placées dans un environnement exempt d'agents pathogènes et traitées conformément aux lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux. Notre protocole animal a été approuvé par le Comité de protection des animaux de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

La lignée tumorale de carcinome pulmonaire de Lewis (Lewis Lung Carcinoma-LLC) transfectée de façon stable pour exprimer à sa surface le peptide SIINFEKL (OVA) associé au CMH de classe I H2Kb (LLC-OVA). Les LLC-OVA a été mise en culture dans du milieu complet (DMEM, 10%FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 50 µg/ml Streptomycin (Invitrogen)) supplémenté de 5mg/ml de G418 (Wisent). Cette lignée tumorale a été choisie car c'est une lignée épithéliale exprimant l'E-Cadherine, le ligand du CD103, essentiel pour vérifier notre hypothèse. 10⁵ LLC-OVA ont été injectées en sous-cutané dans le flanc droit de souris C57BL/6. Les souris ont été sacrifiées lorsque les tumeurs ont atteint un volume de 1 cm³ ou tel qu'indiqué dans l'expérience correspondante.

Activation des lymphocytes T *ex-vivo*:

Des lymphocytes T OT-I (LT-OT-I) ont été isolés à partir des rates de souris OT-IB6SJL (CD45.1) et mis en coculture avec des cellules dendritiques (DC) dérivées de la moelle osseuse de souris B6, pulsées avec le peptide OVA (SIINFEKL), à un ratio de 1:10. Les cellules ont été stimulées en présence (+) ou en absence (∅) du TGF-β (5ng/mL; Feldan). La coculture a été réalisée dans des plaques de 24 puits, dans du milieu complet (RPMI1640 10%FBS) supplémenté de 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 100 U/ml pénicilline et 50 µg/ml Streptomycine et incubée pendant 72 heures à 37°C, à 5% CO₂. Les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse ont été obtenues en cultivant des cellules de la moelle osseuse de souris B6 durant 7 jours, en présence de GM-CSF (20ng/mL; Peprotech) et d'IL-4 (20ng/mL) recombinants murins. Un jour avant la fin de la culture, 150 ng/mL de lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Aldrich) ont été ajoutés à la culture afin de rendre matures les cellules. Les DC ont ensuite été chargées "overnight" avec le peptide ovalbumine (OVA)₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) (2µg/mL), au dernier jour de la culture. Les DC ont été irradiés à 25Gy avant leur utilisation.

Test de migration cellulaire en Transwell:

Afin de tester la capacité des LT-OT-I traités (+) ou non (∅) au TGF-β à migrer en réponse aux ligands recombinants du CXCR3 ou aux surnageants des tumeurs LLC-OVA, un test compétitif de migration *in vitro* a été réalisé dans des chambres à filtre de Boyden (Transwell) de 24 puits avec des pores de 3µm de diamètre (Corning). Pour ce faire, du milieu de culture (DMEM+2% FBS) seul (contrôle négatif) ou contenant des concentrations croissantes de chimiokines recombinantes murines (Biolegend), CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ou du surnageant de tumeurs LLC a été placé dans le compartiment inférieur du Transwell. Les

surnageants des tumeurs LLC utilisés ont été obtenus après culture de la lignée LLC-OVA dans du milieu de culture (DMEM+2%FBS) pendant 16h. Les surnageants ont par la suite été collectés, centrifugés et placés dans le compartiment inférieur du Transwell. D'autre part, les lymphocytes T (2×10^5) récoltés après 3 jours de stimulation en présence (+) ou en absence (\emptyset) du TGF- β (tel que décrit ci-dessus) ont été marqués soit avec du 5 - (and 6) - carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) ou du CellTrace Violet (CTV) (Invitrogen), puis mixés à un ratio de 1:1 (2×10^5) avant d'être placés dans le compartiment supérieur du Transwell. Après 4 heures d'incubation à 37°C, 5% CO₂, les lymphocytes T ayant migré vers la partie inférieure du Transwell ont été énumérés par cytométrie en flux. Afin d'évaluer la migration spécifique aux ligands recombinants du CXCR3, les LT ont été prétraités avec un anticorps neutralisant le CXCR3 (100ng/ml, 2h; CXCR3-173, Biolegend) avant d'être placés dans le compartiment supérieur du Transwell. De même, les LT-OT-I ont été prétraités à la toxine pertussique (PTX) (100ng/ml, 2h; Sigma-Aldrich), un inhibiteur global de la signalisation des récepteurs de chimiokines couplés aux protéines G_{ai}, dans le but de déterminer si la migration des LT est dépendante de ces derniers. Les résultats obtenus ont été rapportés soit en nombre absolu de cellules migrantes ou en taux de migration relative calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux de migration relative} = (+\text{TGF-}\beta \text{ - milieu seul})/(\emptyset\text{TGF-}\beta \text{ - milieu seul})$$

Analyses phénotypiques:

Les anticorps suivants ont été utilisés afin de déterminer le phénotype des LT-OT-I traités ou non au TGF- β : CD8 (53-67), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), CCR7 (4B12), CD69 (H1.2F3), CXCR3 (CXCR3-173), CD103 (M290). L'acquisition des données par cytométrie

en flux a été effectuée sur le cytomètre en flux BD LSR2 ou FORTESSAX20 (BD Biosciences). Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel DIVA Version 8.7 (BD Biosciences) ou le logiciel Flow Logic (Inivai Technologies).

Tests de migration *in vivo*:

Pour déterminer si les LT traités au TGF- β ont une meilleure capacité à migrer vers le site de la tumeur, nous avons réalisé un test de migration compétitif *in vivo*. Pour ce faire, 2×10^6 de LT-OT-I (CD45.1) activés en présence (+) ou en absence (\emptyset) du TGF- β (tel que décrit ci-dessus) ont été marqués soit au CellTrace Violet (CTV) ou au CellTrace Yellow (CTY), puis mixés à un ratio de 1:1, avant d'être injectés par voie intraveineuse à des souris B6 (CD45.2) porteuses d'une tumeur LLC-OVA de 7 jours. Après 3h et 72h du transfert adoptif, les rates et les tumeurs des souris B6 ont été prélevées et apprêtées, puis le ratio de LT-OT-I (CD45.1) fluorescents transférés a été déterminé par cytométrie en flux.

Réponse anti-tumorale et Suivi des tumeurs:

Afin de déterminer si les LT-OT-I traités au TGF- β ont une meilleure réponse anti-tumorale, de par une infiltration plus importante dans la tumeur, 3×10^6 de LT-OT-I(CD45.1) traités (+) ou non (\emptyset) au TGF- β ont été transférés par voie intraveineuse à des souris B6 (CD45.2) porteuses d'une tumeur LLC-OVA de 7 à 10 jours. Un jour avant le transfert adoptive, les souris ont été irradiées à 6Gy. Les souris ont été sacrifiées lorsque le volume des tumeurs a atteint 0.5 à 1cm³. Le volume des tumeurs a été déterminé en mesurant la longueur (l), la largeur (L) et la hauteur (h) de la tumeur, selon la formule suivante: $(l \times L \times h)/2$.

Activation et étude d'expression génique dans les LT humains:

Tel que décrits dans le chapitre 1 des résultats.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPadPrism (version 5.0, pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). Les valeurs de P ont été obtenues soit par des tests de Student non-appariés ou des tests de Wilcoxon appariés, selon l'indication. Toutes les valeurs sont citées \pm un écart-type (SEM). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $P < 0,05$.

2.3 Résultats

2.3.1 Le TGF- β induit l'expression du CD103 et du CXCR3 ex-vivo (Fig. 14)

Afin de déterminer si le TGF- β influence la migration et la rétention des LT dans les tumeurs, nous avons d'abord vérifié son effet sur l'expression de différentes familles de molécules connues pour être impliquées dans la migration des LT ou associées à un phénotype de rétention tissulaire. Après 3 jours d'activation en présence (+) ou en absence (\emptyset) du TGF- β , les LT-OT-I ont été récoltés et phénotypés par cytométrie en flux.

Les résultats obtenus montrent que le TGF- β induit une augmentation significative de l'expression de deux marqueurs phénotypiques associés à la rétention tissulaire: l'intégrine CD103 (9.87% pour (\emptyset) vs 88.10% pour (+)), exprimée par certaines sous population de Trm CD8⁺ (225, 479), et de l'antigène d'activation CD69 (55.90% pour (\emptyset) vs 69.91% pour (+)), une molécule exprimée par la majorité des Trm CD8⁺ et CD4⁺ dans différents tissus chez la

souris (480-482) et décrite comme jouant un rôle important dans la rétention des LT dans la peau (443) et les ganglions lymphatiques *via* la séquestration du récepteur sphingosine1-P(S1PR), impliqué dans l'exclusion des LT des organes lymphoïdes (227, 483). Toutefois, aucune différence dans l'expression de ce dernier n'a été observée. De plus, une diminution de l'expression de la L-Sélectine CD62L (récepteur de "homing") a été observée dans les LT-OT-I traités au TGF- β comparés aux contrôles non traités (68.16% pour (\emptyset) vs 43.07% pour (+)), ce qui concorde avec ce qui est habituellement observé dans les Trm. Cependant, l'expression d'un autre récepteur de "homing", le CCR7, dont l'expression est habituellement inhibée dans les Trm, a été augmentée de façon significative dans les LT-OT-I traités au TGF- β comparés aux contrôles non traités (12.06% pour (\emptyset) vs 25.95% pour (+)). Ce résultat est donc partiellement compatible avec nos données chez l'humain où TGF- β favorisait à la fois une meilleure expression du CCR7 et de CD62L. D'autre part, l'analyse de l'expression d'autres molécules impliquées dans la migration cellulaire, tel que les intégrines LFA1 (CD11a/CD18) et VLA4 (CD29/CD49d), la molécule d'adhésion ICAM1 (CD54) ainsi que les récepteurs de chimiokines CCR2, CCR5 et CXCR4, n'a révélé aucune différence (données non présentées).

Enfin, fait intéressant, nous avons observé une augmentation significative de l'expression du récepteur de chimiokines CXCR3 dans les LT-OT-I traités au TGF- β comparés aux contrôles non traités (18.38% pour (\emptyset) vs 63.63% pour (+)). Le CXCR3 est connu pour être exprimé par les LT effecteurs de type 1 (Th1, CTL) et leur confère la capacité à migrer vers le site de l'inflammation (484) ou de la tumeur (485). L'expression du CXCR3 sur les LT circulants ou de ses ligands, CXCL9 et CXCL10, dans le microenvironnement tumoral est associée à une importante infiltration de ces cellules dans la tumeur et à un bon pronostic chez des patients atteints de cancer colorectal et de mélanome (486-489).

L'ensemble de ces résultats montre que le TGF- β favorise l'expression d'un phénotype de migration/rétention tissulaire dans les LT traités, en augmentant, par exemple, l'expression du CD103 et plus modestement celle du CD69 et en réduisant l'expression du CD62L. De plus, le TGF- β induit une plus forte expression du CXCR3 dans les LT, ce qui pourrait leur conférer une meilleure capacité migratoire.

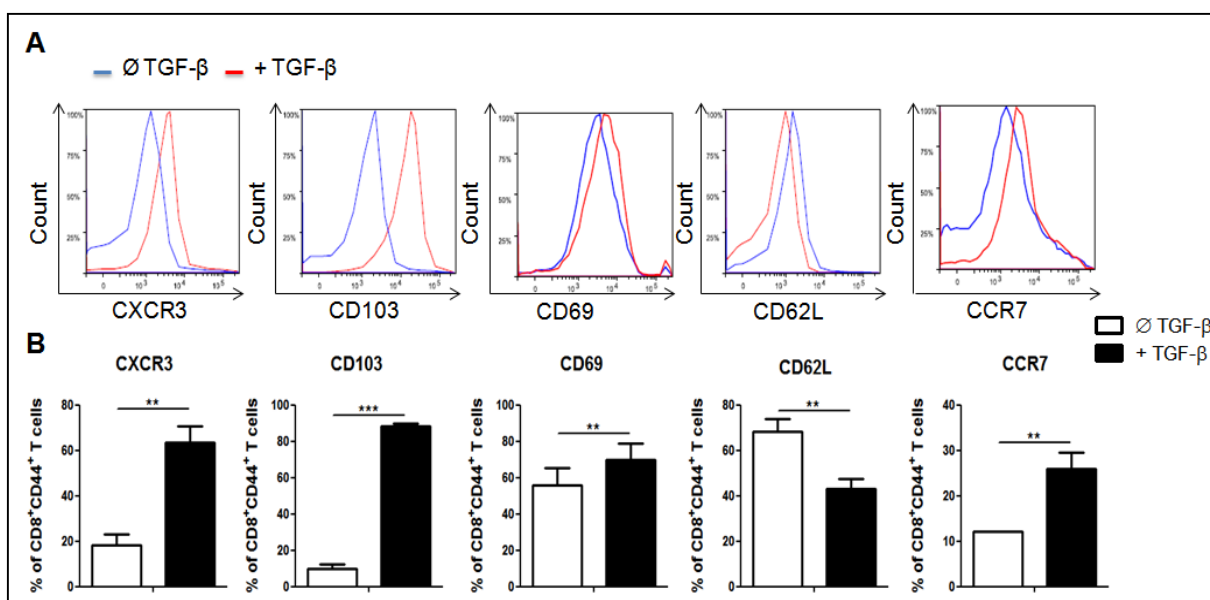


Figure 14: Le TGF- β induit l'expression du CD103 et du CXCR3 ex-vivo

Après 3 jours de stimulation en présence (+) ou en absence (\emptyset) de TGF- β , les LT-OT-I ont été récoltés puis phénotypés par cytométrie en flux. Histogrammes représentatifs (A) ou pourcentages (B) de LT-OT-I (CD8⁺CD44⁺) traités (linge rouge ou barre noire) ou non traités (ligne bleu ou barre blanche) au TGF- β , exprimant le CXCR3, CD103, CD69, CD62L et CCR7. Données obtenues à partir de 3 à 6 expériences différentes (mean +/- SEM; one tailed paired t test.; ** P< 0.01, *** P< 0.001).

2.3.2 Les cellules T traitées au TGF- β ont une meilleure capacité à migrer *in vitro* en réponse aux ligands du CXCR3 et aux surnageants de LLC-OVA

Après avoir observé que le TGF- β favorisait une plus forte expression du CXCR3 dans les LT-OT-I effecteurs (CD8⁺CD44⁺), nous avons voulu déterminer si ceci leur conférerait une meilleure capacité à migrer en réponse aux ligands recombinants du CXCR3. Pour le tester, nous avons effectué un test de migration compétitif *in vitro*. Des LT-OT-I spécifiquement activés pendant 3 jours en présence(+) ou en absence (\emptyset) du TGF- β ont été marqués soit au CFSE ou au CTV, puis placés à un ratio de 1:1 dans le compartiment supérieur d'un Transwell. La capacité des cellules à migrer du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur, contenant des concentrations croissantes des ligands du CXCR3, a été mesurée en quantifiant par cytométrie en flux le nombre de cellules fluorescentes présentes dans le compartiment inférieur. Les résultats obtenus montrent que comparés aux contrôles non traités, les LT-OT-I traités au TGF- β ont une meilleure capacité migratoire *in vitro* en réponse au CXCL9, CXCL10, CXCL11 recombinants ou à l'ensemble des 3 chimiokines (Fig. 15A-B). Cette migration semble cependant être inhibée lorsque les LT-OT-I sont prétraités avec un anticorps bloquant spécifiquement le CXCR3 (α CXCR3) (Fig. 15C) ou avec de la toxine pertussique (PTX) (Fig. 15C). Ce dernier résultat doit toutefois être confirmé sur un plus grand nombre d'échantillons. Globalement, ces résultats montrent que le TGF- β améliore la capacité des LT-OT-I à migrer *in vitro* en réponse aux ligands recombinants du CXCR3 et que cet effet est dépendant de la signalisation des protéines G_{i α} et du CXCR3. Ceci suggère qu'ils pourraient également mieux migrer vers des tumeurs exprimant ces chimiokines. Pour le vérifier, nous avons donc évalué la capacité des LT-OT-I effecteurs à migrer en réponse aux surnageants des

tumeurs LLC-OVA. Les résultats montrent que le TGF- β augmente de façon significative la migration des LT-OT-I vers les surnageants des tumeurs LLC-OVA comparés aux contrôles non traités (Fig.15D). Cette migration semble toutefois être bloquée lorsque les LT-OT-I sont prétraités avec de l' α CXCR3 ou de la PTX (Fig.15E) (mais ces résultats devront également être confirmés). Ces résultats suggèrent que le traitement ex-vivo des LT-OT-I avec du TGF- β favorise leur migration vers les surnageants de tumeurs LLC-OVA de façon dépendante des récepteurs couplés aux protéines G α i et plus spécifiquement du CXCR3.

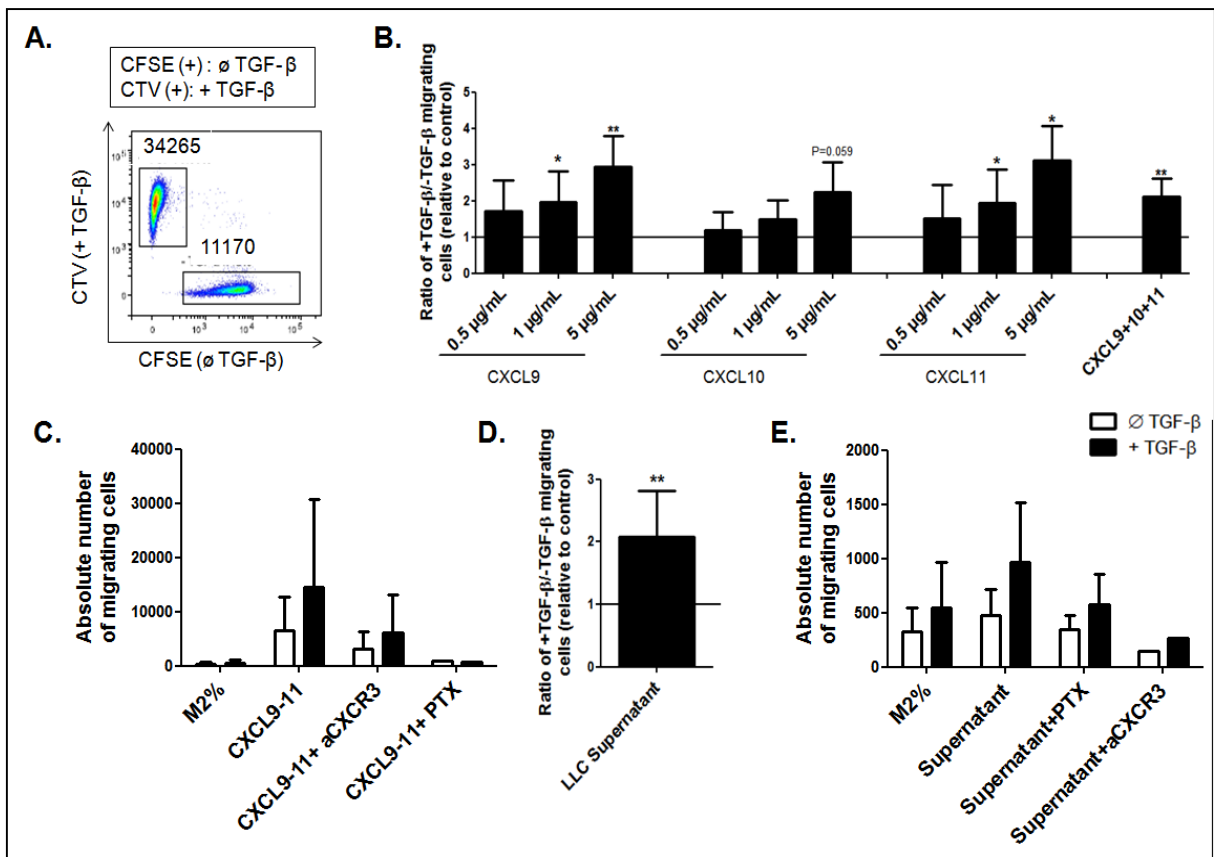


Figure 15: Les cellules T traitées au TGF- β ont une meilleure capacité à migrer in-vitro en réponse aux ligands du CXCR3 et aux surnageants de LLC-OVA

(A). Dot plot représentatif des LT, ayant migrés vers le compartiment inférieur du Transwell, analysé par cytométrie en flux. (B et D). Ratio des LT-OT-I effecteurs traités relatif aux contrôles non traités au TGF- β et qui ont migré en réponse aux ligands recombinants du CXCR3 (CXCL9-11) (N=3-6) (B et C) ou aux surnageants de LLC-OVA (N=3-7) (D et E). Nombre absolu de LT-OT-I traités (noire) ou non (blanche) avec du TGF- β après prétraitement avec un anticorps bloquant le CXCR3 (aCXCR3) ou avec de la toxine Pertussis (PTX) suite à un test de migration compétitif en réponse aux ligands de CXCR3 (CXCL9-11) (N=3) (C) ou aux surnageants de LLC-OVA (N=3) (E). Données (moyenne +/- SEM; one tailed paired t test. *P< 0.05, **P< 0.01).

2.3.3 TGF- β aide à améliorer l'infiltration des LT-OT-I dans les tumeurs LLC-OVA

Pour vérifier si le TGF- β peut améliorer la migration des LT-OT-I vers le site de la tumeur LLC-OVA, nous avons réalisé un test de migration compétitif *in vivo* à court (3h) et à moyen-terme (72h). Après 3 jours de stimulation *ex-vivo* en présence (+) ou en absence (\emptyset) du TGF- β , les LT-OT-I effecteurs récoltés (CD45.1) ont été marqués soit au CFSE ou au CTV, puis mixés a un ratio de 1:1 avant d'être injectés par voie intraveineuse à des souris B6 (CD45.2) porteuses de tumeurs LLC-OVA de 7 jours. Après 3 et 72 heures du transfert adoptif (AT), les rates et les tumeurs des souris injectées ont été prélevées, puis la proportion des LT-OT-I (CD45.1) infiltrant, marqués au CTV (\emptyset) ou au CFSE (+) a été mesurée par cytométrie en flux (Fig. 16A). Les résultats obtenus montrent que les LT-OT-I traités au TGF- β infiltrent plus efficacement les tumeurs LLC-OVA après 3h du transfert adoptif (Fig. 16 C-haut). L'infiltration des LT transférés observée durant ce court laps de temps (3h) est probablement due à une meilleure capacité des LT-OT-I traités au TGF- β à migrer et/ou infiltrer la tumeur,

puisque ce temps n'est pas suffisant pour la mise en place d'autres processus (prolifération *in situ*, survie, rétention,..) pouvant influencer l'étendue de l'infiltration tissulaire. La migration précoce des LT-OT-I traités au TGF- β pourrait être liée au fait que ces cellules expriment plus de CXCR3. De même, une plus grande proportion de LT-OT-I traités au TGF- β a été retrouvée dans les tumeurs après 72h du TA, comparé aux contrôles non traités présents en plus faible proportion (Fig. 16 C-bas). Durant ce laps de temps plus long, d'autres processus ont pu être mobilisés, tel que la rétention dans la tumeur des LT traités au TGF- β *via* l'interaction du CD103 et son ligand, l'E-cadhérine, ou encore une plus faible exclusion de ces cellules de la tumeur grâce à une plus forte expression du CD69. Une plus grande proportion de LT-OT-I traités au TGF- β a également été retrouvée dans les rates des souris B6, 3h et 72h après le TA. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces cellules expriment plus fortement le CCR7 et le CXCR3 qui permettraient leur recrutement vers la rate, ainsi que le CD69 qui empêcherait leur exclusion de la rate. De plus, une étude dans un modèle de granulomatose hépatique chez la souris a montré que l'induction immédiate de l'expression du CXCR3 durant la phase d'activation des LT dans les organes lymphoïdes secondaires coïncide avec une augmentation de la production de ses ligands, CXCL9 et CXCL10, par les DC matures. Les LT activés sont ainsi séquestrés jusqu'à 4 jours dans les ganglions drainant avant d'être recrutés dans les tissus périphériques. Bien que cette étude ne soit pas directement liée à nos observations, ces données pourraient laisser entrevoir un rôle potentiel du CXCR3 dans la rétention des LT dans la rate les premiers jours suivant leur transfert (490).

Ces résultats suggèrent que le TGF- β améliore la capacité des LT-OT-I à migrer et à infiltrer la tumeur LLC-OVA *in vivo*.

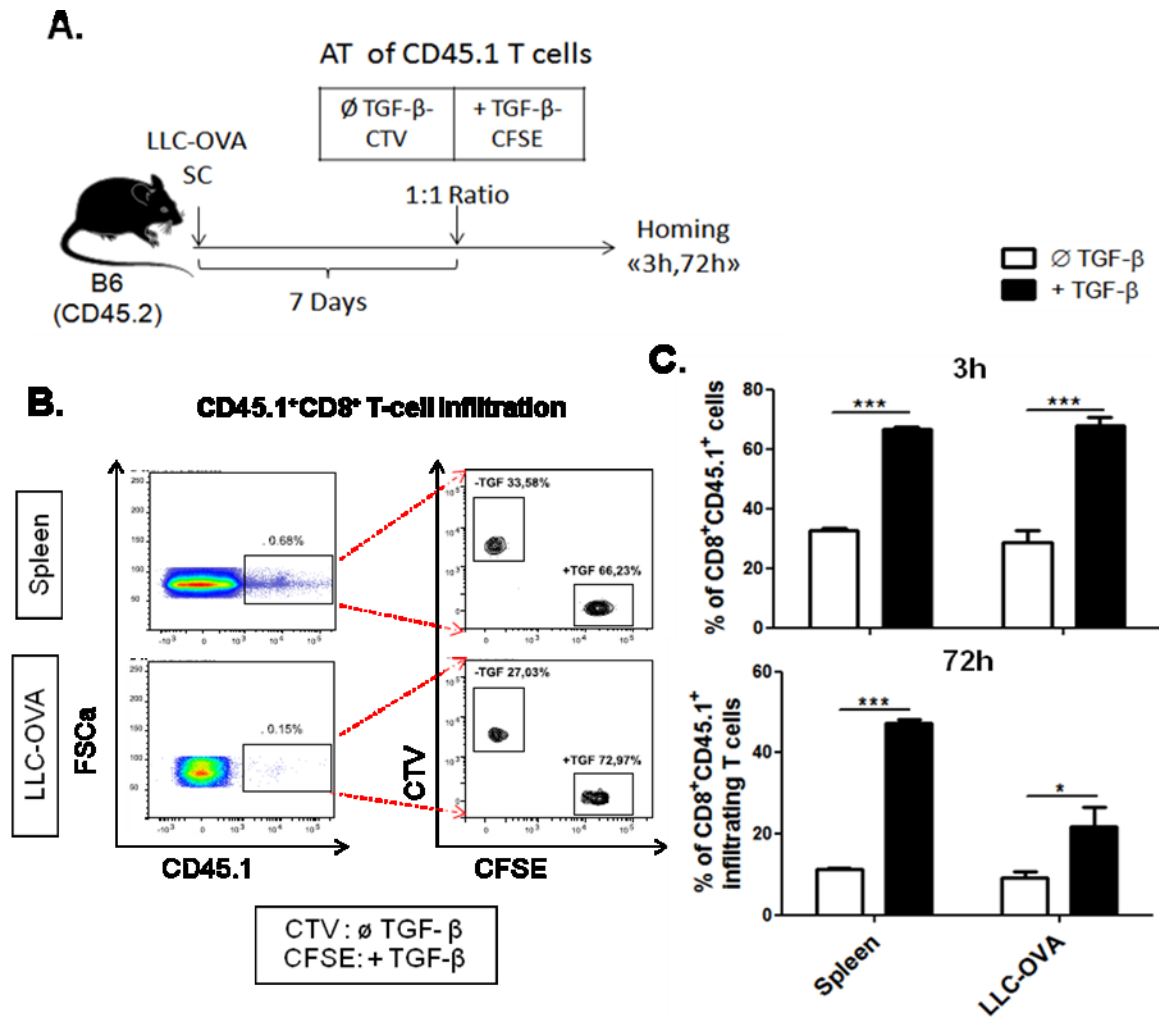


Figure 16: TGF-β aide à améliorer l'infiltration des LT-OT-I dans les tumeurs LLC-OVA

Un test de migration compétitif à court- (3h) et à moyen-terme (72h) a été réalisé *in vivo* afin de déterminer si la stimulation ex-vivo des LT-OT-I avec du TGF-β peut améliorer leur migration vers la tumeur LLC-OVA. (A). Schéma expérimental explicatif du test de migration *in vivo*. Dot plot représentatif (B) et compilation (C) du pourcentage de LT-OT-I transférés, traités (noire) ou non (blanche) avec du TGF-β, déterminés par cytométrie en flux, dans les

tumeurs et les rates des souris B6 après un test de migration compétitif de 3 h (panel supérieur; N=3) et de 72 h (panel inférieur; N=4). Données (moyenne +/- SEM; test t non apparié)

2.3.4 Les LT traités au TGF- β ralentissent de façon modeste mais significative le développement de la tumeur

Après avoir confirmé que les LT-OT-I traités au TGF- β présentaient une meilleure capacité à infiltrer les tumeurs LLC-OVA, nous avons voulu vérifier si cela pouvait influencer l'efficacité de leur réponse anti-tumorale. Pour cela, nous avons transféré par voie intraveineuse une seule dose de LT-OT-I traités (+) ou non (\emptyset) au TGF- β à des souris B6 (CD45.2) porteuses de tumeurs LLC-OVA de 7 à 10 jours, puis nous avons suivi la progression tumorale (Fig. 17A). Malgré l'infiltration d'un nombre relativement plus important de LT-OT-I traités au TGF- β dans les tumeurs LLC-OVA à la fin de l'expérience, comparé aux contrôles non traités présents en plus petit nombre (Fig. 17C), l'efficacité de la réponse anti-tumorale est peu affectée. En effet, 5 à 7 jours après le TA (10 à 14 jours après l'inoculation de la tumeur), on observe un ralentissement significatif de la croissance tumorale dans le groupe de souris ayant reçues des LT-OT-I traités au TGF- β (Fig. 17B). Cependant, cette différence s'estompe peu à peu par la suite, jusqu'à disparaître à la fin de l'expérience. Ces résultats suggèrent que le traitement *ex-vivo* des LT-OT-I avec du TGF- β aide à améliorer l'infiltration et la rétention des cellules au site de la tumeur, mais n'est pas suffisant à lui seul pour éliminer ou ralentir durablement la croissance tumorale. Toutefois, le ralentissement de la progression tumorale observé à des temps précoces dans le groupe ayant reçu des LT-OT-I traités au TGF- β , nous laisse une petite fenêtre pour intervenir et bonifier notre stratégie thérapeutique en associant le traitement *ex-vivo* des LT au TGF- β à d'autres stratégies thérapeutiques, telle l'utilisation d'inhibiteurs de points de contrôle (*checkpoint blockade*), qui

par un effet synergique pourraient améliorer l'efficacité thérapeutique des LT infiltrant la tumeur.

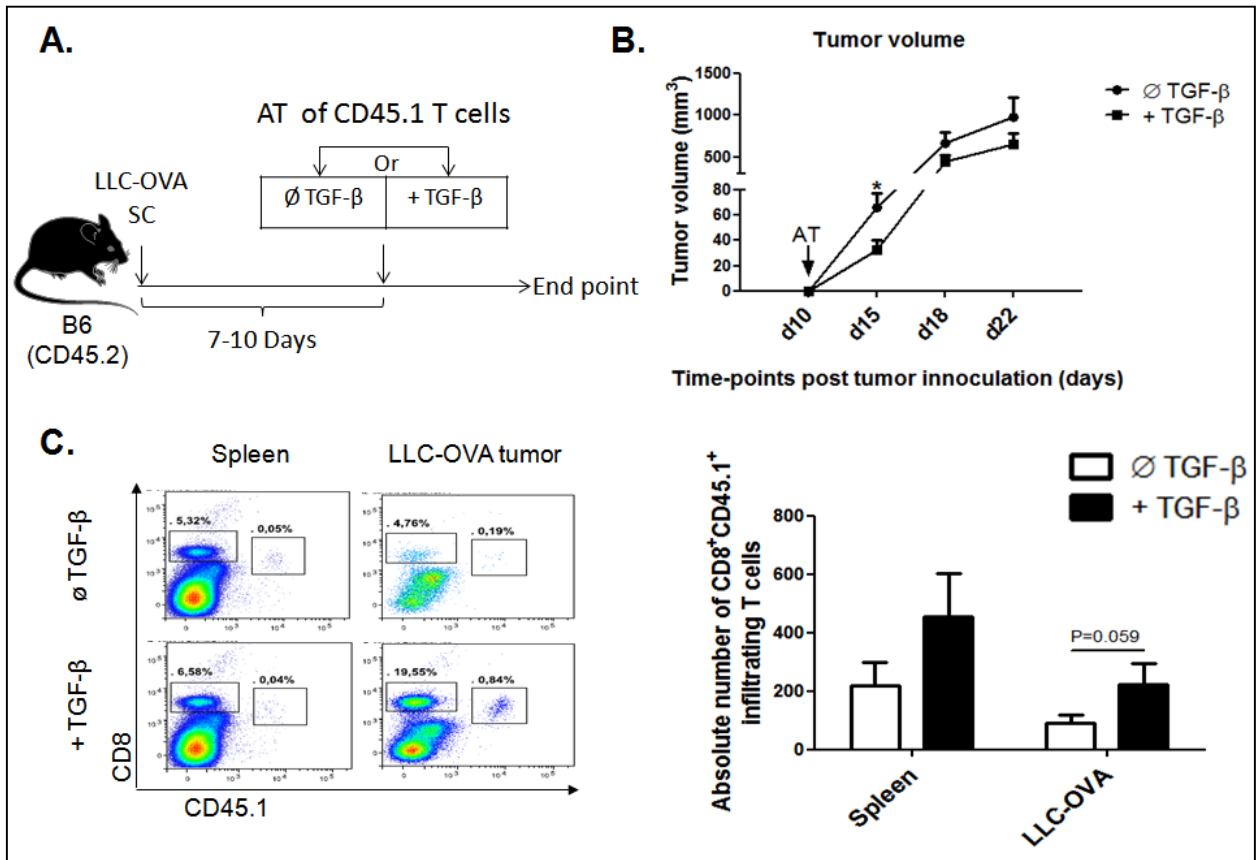


Figure 17: Les LT traités au TGF- β ralentissent de façon modeste mais significative à des temps précoces le développement de la tumeur

(A). Schéma expérimental explicatif for anti-tumor response essay. (B) Croissance tumorale dans le temps (N=9). (C). Gauche, dot plots représentatifs et Droite, nombre absolu de LT transférés traités (noire) ou non (blanche) au TGF- β , dans la rate et les tumeurs LLC-OVA à la fin de l'expérience. (D). Gauche, dot plots représentatifs et Droite, pourcentage de

LT transférés exprimant le CD103 dans la rate et les tumeurs LLC-OVA à la fin de l'expérience. Données (moyenne +/- SEM; one tailed paired t test. *P< 0.05).

2.3.5 TGF- β induit l'expression du CD103 dans les LT humains stimulés *ex vivo* ainsi qu'un programme transcriptionnel associé aux Trm

Au vu de l'importance de l'effet du TGF- β sur l'expression du CD103 et l'infiltration tumorale chez la souris, nous avons étendu notre étude à l'humain. Tout d'abord, nous avons étudié l'effet du TGF- β sur l'expression du CD103 dans des cultures de LT humains stimulés soit de façon non spécifique avec un anti-CD3 et anti-CD28 ou par un protocole pré-clinique de culture de lignées cellulaires dirigées contre un antigène viral (bibliothèque de peptide EBNA1) (tel que décrit dans le chapitre 1 des résultats). Après 7 jours d'activation par α CD3/ α CD28, les LT traités au TGF- β (+) exprimaient 50% plus de CD103 que les contrôles non traités (\emptyset) (Fig. 5A). De même, le TGF- β a augmenté de plus de 70% l'expression du CD103 dans les lignées anti-virales au jour 14 de la culture. Cette différence se maintient 7 jours après l'arrêt de l'exposition des cellules au TGF- β (jour 21 de la culture), avec une expression de 53.4% pour les LT traités au TGF- β (+) contre seulement 1.5% de LT exprimant du CD103 dans le groupe contrôle non traité (\emptyset). 14 jours après l'arrêt du traitement au TGF- β , l'expression du CD103 diminue considérablement, mais reste plus importante dans le groupe traité au TGF- β comparé au groupe contrôle (6% (\emptyset) VS 18.5% (+)) (Fig. 18B). Ces résultats montrent que le TGF- β induit significativement et durablement l'expression du CD103 dans les LT humains stimulés *ex-vivo*.

Par la suite, nous avons évalué l'impact global du TGF- β sur l'expression de différents gènes associés aux Trm (245) en réalisant un séquençage de l'ARN sur des LT CD8⁺ triés

après 7 jours d'activation en aCD3/aCD28. Les résultats obtenus montrent que TGF- β augmente l'expression des gènes qui codent pour des molécules d'adhésion *Itgae* (code pour le CD103), *Chd1* (code pour l'E-cadhérine)) et des régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS1, RGS16 et RGS19) impliqués dans la rétention tissulaire (245). Nous n'avons cependant pas observé de différence dans l'expression des gènes codant pour des molécules qui régulent l'exclusion tissulaire, telle que le CD69, S1PR1, S1PR4 et S1PR5. Toutefois, TGF- β a augmenté significativement l'expression du gène qui code pour le CCR7, ce qui est contradictoire avec un phénotype de rétention, mais qui corrobore les résultats obtenus chez la souris au niveau protéique (Fig. 14). Le TGF- β a également modulé l'expression de plusieurs facteurs de transcription essentiels à la migration des LT et à l'établissement d'un phénotype de rétention tissulaire: TGF- β a significativement inhibé l'expression de *Klf2*, connu pour inhiber la rétention des cellules dans les tissus (491), et de *Tbx21* (codant pour le facteur de transcription T-bet) et qui est habituellement inhibé dans différentes populations de Trm (251, 492). T-bet est connu pour diminuer la sensibilité des Trm au TGF- β en inhibant l'expression de son récepteur (254, 493). En contrepartie, TGF- β a augmenté l'expression du gène qui code pour le *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AhR), requis pour le maintien de plusieurs populations de Trm, mais dont le rôle exact reste à déterminer (252, 259, 494, 495), ainsi que l'expression de *Notch* (codant pour le facteur de transcription NOTCH1), qui a récemment été défini comme jouant un rôle crucial dans le maintien des Trm (250). Toutefois, nous avons observé une diminution de l'expression de *Prdm1* (codant pour le facteur de transcription Blimp1), connu pour maintenir la rétention des Trm dans les tissus en inhibant l'expression de CCR7, S1pr1 et Klf2. Afin de déterminer si le TGF- β améliore la migration et la rétention des LT humains dans la tumeur, d'autres expériences de phénotypage (exp. expression du CXCR3), de tests

migration *in vivo* et *in vitro* et de réponse anti-tumorale, devront être réalisées sur des modèles tumoraux humains.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le TGF- β induit un programme génétique mixte lors d'une stimulation et expansion *ex vivo*. Ayant précédemment démontré qu'une différenciation Tcm associée à des niveaux bas de BLIMP-1 et l'expression d'ID3 (voir article 1) dans des conditions similaires, nos travaux re-soulignent la nature profondément pléiotropique du TGF- β . Une meilleure compréhension des signaux pouvant consolider les destins Tcm ou Trm suite à l'exposition au TGF- β nous aidera à préparer de façon plus optimale les lymphocytes T *ex vivo* dans des contextes d'immunothérapie adoptive.

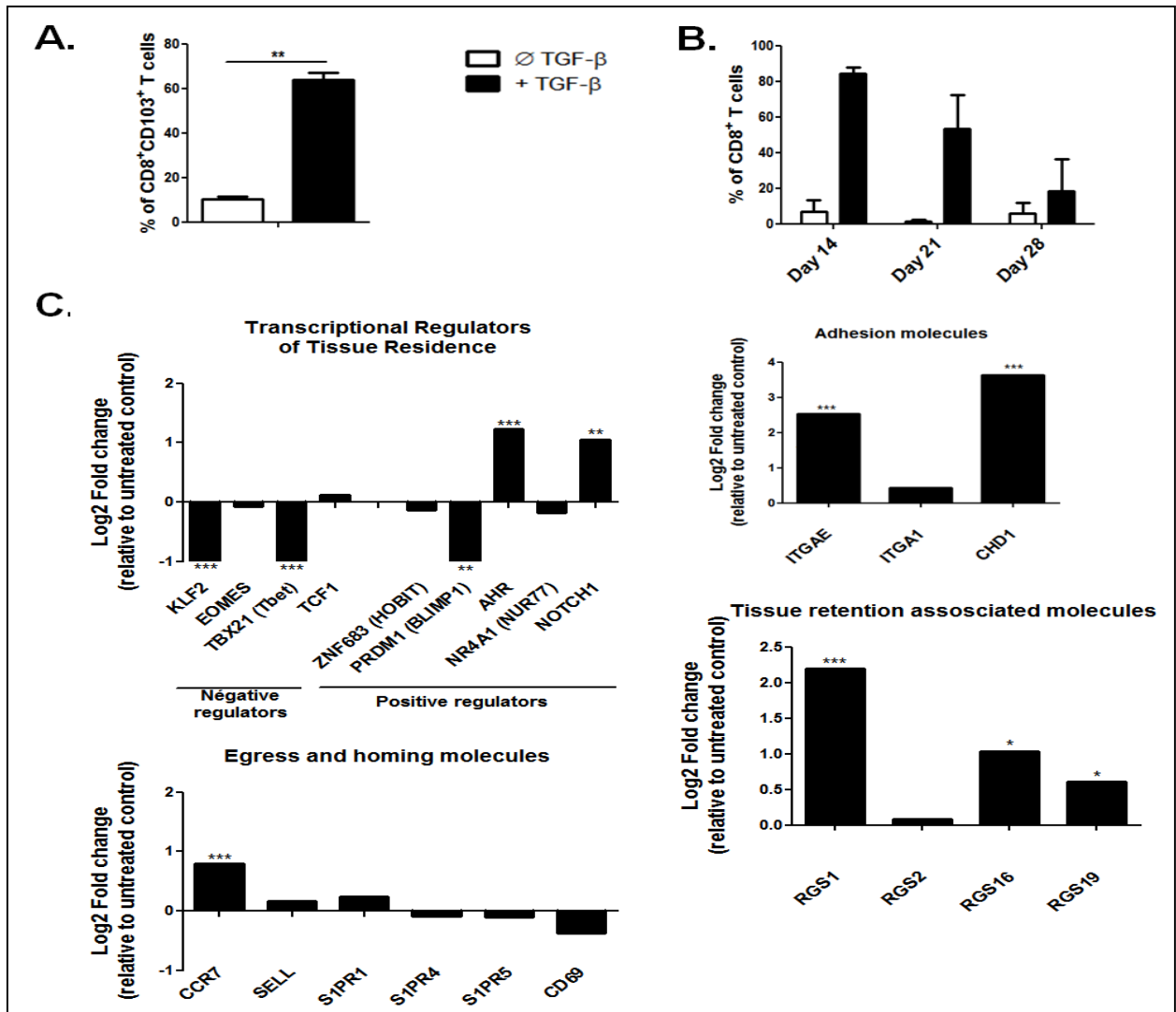


Figure 18: TGF- β induit l'expression de CD103 dans les LT humains stimulés *ex-vivo* ainsi qu'un programme transcriptionnel associé aux Trm

(A-B). Pourcentages de LT CD8⁺ exprimant le CD103 après (A) une stimulation avec α CD3/ α CD28 après 7 jours de culture (N=3) ou (B) Une stimulation spécifique de l'antigène- (contre une librairie de peptides EBNA1) aux jours 14,21 et 28 de cultures (N=2). **P< 0.01, by one-tailed paired t-test. (C). Analyses d'expression génique de différents facteurs et molécules associés à la migration et/ou rétention tissulaire sur des LT CD8⁺ triés après 7 jours de culture en présence ou en absence de TGF- β (4 donneurs). Les Données sont représentés en expression différentielle (log₂) des transcrits indiqués sur les LT exposés au TGF- β relative à la condition contrôle (pas de TGF- β exogène), arbitrairement positionnée à 0. **p<0.01, ***p<0.001

Discussion

1. Le TGF- β dans la différenciation mémoire des lymphocytes

T humains

L'immunothérapie adoptive constitue une stratégie prometteuse pour le traitement des cancers avancés, comme en témoigne l'impressionnante réponse anti-tumorale obtenue chez certains patients traités avec les CAR T ou les TIL. Cependant, cette réponse peut encore être améliorée, puisque souvent seul un retardement de la progression tumorale et une réponse non durable à long terme sont observés. Une meilleure efficacité clinique de l'IA pourrait être obtenue en générant des produits cellulaires T spécifiques aux tumeurs avec un stade de différenciation précoce, tels que les Tscm ou les Tcm, qui ont une meilleure longévité, une capacité proliférative supérieure, une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en puissantes cellules effectrices (207). Différentes approches ont été testées pour atteindre cet objectif, notamment, l'utilisation *ex-vivo* de différents candidats pharmacologiques ou cocktail de cytokines (268) capables de favoriser un phénotype mémoire des LT, tels que ceux activant la voie Wnt/ β -caténine (222) et ceux inhibant la traduction des protéines médiée par mTOR (496). En notant qu'un des défis dans l'utilisation dans ce type d'approche est de parvenir à restreindre la différenciation des LT sans altérer leur prolifération et leur fonctionnalité. C'est dans cette optique que s'est inscrite notre étude où nous avons démontré que la stimulation des LT humains avec du TGF- β exogène durant la phase d'activation *ex-vivo*, dans différents contextes de culture, favorise une différenciation mémoire de ces LT, au niveau phénotypique

et transcriptionnel, tout en améliorant la production polyfonctionnelle des cytokines, sans altérer l'expansion des LT ni conduire à la génération de TReg. De plus, nos données montrent qu'une brève exposition au TGF- β peut programmer un effet durable sur les LT *in vivo*, comme attendu pour des cellules T mémoire précoces. En effet, dans les deux modèles *in vivo* utilisés, GVHD et réponse anti-tumorale, les LT exposés au TGF- β *ex vivo* ont montré une meilleure réactivité *in vivo*. Globalement, ces résultats confirment que le gain de Tcm apporté par l'exposition au TGF- β est suffisant pour amener un effet cliniquement significatif.

1.1 TGF- β induit l'expression de marqueurs associés à la différenciation mémoire des LT

Dans le système hématopoïétique, le TGF- β est considéré comme un facteur de quiescence qui favorise la conservation des cellules souches (440) ainsi que la conservation des cellules T en mémoire (400) et la survie des cellules T naïves (467). De plus, il a été démontré que le TGF- β atténue la signalisation en aval du récepteur des cellules T (378, 497) et du CD28 (375). Dans cette étude, nous avons donc exploré le potentiel du TGF- β à favoriser une différenciation mémoire des LT humains en vue d'une application thérapeutique. Nos données ont montré que l'exposition *ex-vivo* des LT au TGF- β après une stimulation anti-CD3/CD28 a en effet conduit à une différenciation mémoire de ces LT, associée à une plus forte expression des récepteurs de "*homing*", CD62L et CCR7, par rapport aux contrôles non traités, et ce, aussi bien à partir d'une population totale de LT qu'à partir de LT CD4⁺/CD8⁺ naïfs ou mémoires préalablement triés par FACS. Toutefois, le TGF- β ne semble avoir aucun effet sur la différenciation des Tem préalablement trié par FACS. Ces résultats indiquent que le TGF- β favorise la différenciation mémoire des LT humains naïfs et le maintien du

phénotype mémoire des T_{em} préexistants. Nos résultats concordent avec une étude *in vivo* chez la souris qui a montré qu'une signalisation continue du TGF- β a été requise pour la différenciation et le maintien des LT CD8⁺ mémoire (400). Cependant, nos résultats contrastent avec ceux d'une autre étude réalisée principalement chez la souris et indiquant que le blocage de la signalisation du TGF- β endogène dans les cellules T CD8⁺ favorisait l'expansion des cellules T_{em} par rapport à d'autres sous-types (462), en réduisant l'expression du CD62L. Dans notre étude, l'inhibition de la signalisation du TGF- β endogène par le GW788388 favorise au contraire une différenciation T_{em}, consolidant ainsi nos données obtenues avec l'addition de TGF- β exogène. Cette divergence peut être liée à des différences dans la conception des expériences (exp. Différents inhibiteurs utilisés, type de stimulation (aCD3/CD28 vs aCD3 seul, type cellulaire testé (T enrichis vs PBMCs)) ou à des différences entre l'humain et la souris.

D'autre part, l'induction de l'expression du CCR7 par le TGF- β a déjà été observée dans des LT CD8⁺ mémoires spécifiques isolés à partir de patients atteints de mélanomes et stimulés au TGF- β durant la phase initiale d'activation *ex-vivo* (283) ainsi que sur des cellules de cancer du sein durant la transition épithélo-mésenchymateuse (498). De plus, dans un modèle de VIH, une étude a montré que le TGF- β pouvait convertir des LT T_{em} en T_{em} en induisant l'expression du CCR7 (499), ce qui est en contradiction avec nos observations, puisque le TGF- β n'avait pas d'effet sur la différenciation des T_{em} dans notre système.

L'induction des récepteurs de "*homing*" pour les organes lymphoïdes par le TGF- β sur les LT humains indique que ces cellules sont étroitement liées aux cellules T mémoire précoces. La forte expression de ces récepteurs permet la migration des lymphocytes T vers

les organes lymphoïdes où ils peuvent être activés par les cellules présentatrices d'antigène (500) et permet également une migration efficace vers la moelle osseuse, ce qui a été associé à une amélioration de l'efficacité clinique du transfert adoptif de LT du donneur chez des patients atteints de leucémie (501).

Afin de valider nos observations dans un protocole cliniquement pertinent, nous avons testé l'effet potentiel du TGF- β à conférer un phénotype Tcm sur des lignées de cellules T dirigées contre les peptides antigéniques du virus Epstein-Barr, EBNA-1 (*Epstein-Barr nuclear antigen 1*). Les résultats obtenus ont confirmé le potentiel du TGF- β à induire l'expression de marqueurs associés à la différenciation mémoire des LT et ce malgré des stimulations répétées des lignées par les antigènes en absence de TGF- β exogène au-delà du jour 14 de culture (sur 28 jours de culture).

Ces données suggèrent qu'une exposition précoce des cellules T au TGF- β pendant la phase initiale de stimulation, quel que soit le type de stimulation appliquée (non spécifiques en anti-CD3/CD28 ou avec des peptides antigéniques), favorise globalement l'expression des marqueurs associés au phénotype Tcm. Ceci est d'une grande pertinence en clinique, puisque notre protocole pourrait aussi bien être appliqué à des cultures nécessitant une stimulation non spécifique, telle que les CAR-T, qu'à des cultures antigènes spécifiques anti-tumorales ou anti-virales.

Enfin, l'addition du TGF- β exogène ou le blocage de sa signalisation sur les LT activés en aCD3/CD28 a eu un impact plus modeste sur l'expression d'autres marqueurs associés au phénotype mémoire des LT, tels que le CD27, le CD28 et le CD127. En effet, une diminution statistiquement significative, mais biologiquement modeste, de la proportion de LT exprimant

le CD27 a été observée dans la condition TGF- β après 14 jours de stimulation. Une proportion légèrement inférieure de LT CD8⁺ exprimant CD127 et CD28 traités par GW388788 a été observée après 7 et 14 jours de culture. La diminution de l'expression du CD27 par le TGF- β a déjà été observée par Yang et al., dans des TIL CD70⁺ isolés à partir de patients atteints d'un lymphome folliculaire, en augmentant l'expression du CD70⁺. La signalisation via CD27/CD70 dans ces cellules aurait une rétroaction négative sur l'expression du CD27 en induisant son clivage à la surface de ces cellules (502). Dans notre cas, il se pourrait que le TGF- β réduise l'expression du CD27 par le même mécanisme, puisque nos LT traités au TGF- β expriment également plus de CD70 (données non présentées). Cependant, bien que la diminution de l'expression du CD27 soit statistiquement significative et qu'elle ne corresponde pas au phénotype mémoire des LT, le niveau de son expression reste généralement élevée et ne semble pas avoir d'effet sur le phénotype global ni la fonction des LT. De plus, contrairement aux LT stimulés avec de l'anti-CD3/CD28, les lignées anti-EBV stimulées spécifiquement avec des DC chargés au peptide EBNA1 en présence du TGF- β montrent une plus forte expression du CD27 que les contrôles non traités, mais aucune différence n'a été observée pour l'expression du CD28 et du CD127.

1.2 TGF- β imprime une signature génétique mémoire sur les LT humains

D'un point de vue transcriptionnel, le séquençage d'ARN réalisé sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ stimulés pendant 7 jours en présence ou en absence du TGF- β a révélé une expression différentielle de plusieurs gènes associés aux phénotypes mémoire et effecteurs des LT entre les deux conditions expérimentales (207, 222, 234, 381, 446, 447). En effet, TGF- β a inhibé l'expression de plusieurs transcrits associés à la différenciation effectrice des LT, tels

que les granzymes (GZM), le ligand de FAS (FASLG), STAT4, SOCS3, ID2, IFN- γ ainsi que les facteurs de transcription clés de la différenciation effectrice des LT, *PRDMI* et *TBX21*. Inversement et conformément à la différenciation Tcm, l'exposition au TGF- β a induit une augmentation de l'expression de plusieurs gènes associés à la différenciation mémoire des LT, tels que *ID3*, *FOXP1*, *SOX4* et *FOXO1*.

Parmi les nombreux gènes différenciellement régulés par TGF- β , nous avons identifié deux gènes importants, *PRDMI* (codant pour BLIMP1) et *ID3* (codant pour ID3), jouant un rôle clé dans la différenciation effecteur et mémoire des LT, respectivement. En effet, BLIMP1 (*B lymphocyte induced maturation protein-1*), codé par le gène *PRDMI*, a initialement été défini comme répresseur transcriptionnel des lymphocytes B. Il joue un rôle clé dans la détermination du destin des LB en régulant les gènes favorisant la différenciation terminale des LB en plasmocytes et non en LB mémoire. BLIMP1 est également important pour le développement de multiples lignées au cours de l'embryogenèse et favorise la différenciation terminale des kératinocytes de la peau (503). Plus récemment, BLIMP1 a été défini comme un facteur clé dans la différenciation terminale des LT CD8⁺ et leur fonction ainsi que dans l'inhibition de la différenciation mémoire des cellules T (504-506), notamment par l'induction de *TBX21* (465) et la répression de *BCL6* et *ID3*, facteurs de transcription associés à la mémoire (455, 505). Toutefois, des souris présentant des délétions spécifiques de Blimp-1 dans les LT développent une immunopathologie sévère, suggérant la nécessité de Blimp-1 dans l'homéostasie des cellules T et la tolérance immunitaire (504). ID3 est quant à lui membre de la famille des protéines ID (*Inhibitor of DNA-binding/differentiation proteins*). Dans les cellules souches embryonnaires (CSE), les protéines ID bloquent leur différenciation en antagonisant l'activité transcriptionnelle des protéines E. Par conséquent, la surexpression

du facteur de transcription 3 (également appelé E2A) dans les CSE inhibe la capacité des protéines ID à maintenir les CSE (507) et leur auto-renouvellement. Comme dans les CSE, les protéines ID sont maintenant reconnues comme des régulateurs clés dans la formation des LT CD8⁺ mémoire. Ainsi, les LT CD8⁺ déficientes en ID3 ont un nombre restreint de LT mémoire et sa surexpression suffit à restaurer la survie à long terme des LT KLRG1⁺ différenciés (234, 455) de façon terminale. Comme observé dans les CES, ID3 induit son effet en limitant l'activité des protéines E. En effet, la suppression d'E2A dans les lymphocytes T CD8⁺ augmente la formation de lymphocytes T mémoire en réponse à une infection virale, récapitulant le phénotype provoqué par l'expression forcée d'ID3 (455, 508).

Le profil d'expression génique instruit par TGF- β sur les LT humains, associé à la suppression de BLIMP-1 et la surexpression d'ID3 au niveau protéique, concordent avec ce qui a préalablement été décrit sur la signature effecteur versus mémoire des LT (207).

Ces résultats qui associent pour la première fois le TGF- β aux bases moléculaires de la différenciation mémoire des cellules T humaines sont nouveaux et élargissent notre compréhension sur le rôle du TGF- β dans la biologie des lymphocytes T, mais soulèvent par la même occasion plusieurs questions. Des études ultérieures seront nécessaires pour déterminer le mécanisme précis par lequel TGF- β induit son effet sur les LT.

Une des hypothèses serait que le TGF- β agit indirectement en atténuant les signaux d'activation des cellules T. En effet, il a été démontré que le TGF- β atténue la signalisation en aval du récepteur des cellules T et du CD28 (375, 378, 379). En accord avec le modèle de différenciation progressive des LT, qui propose qu'en fonction de la force et de la qualité du signal d'activation perçu par les LT naïfs, ceux-ci vont progressivement se différencier en

Tscm, Tcm, Tem pour culminer en cellules T effectrices différenciées de façon terminale (223). De ce fait, en atténuant le signal d'activation des LT, le TGF- β pourrait ralentir la différenciation des LT. Pour le déterminer, nous avons tenté d'étudier l'impact du TGF- β sur la signalisation proximale et distale du TCR en mesurant la phosphorylation de différentes protéines impliquées dans la signalisation du TCR et de co-stimulation (CD28) par phosflow et Western Blot. Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence en présence ou en absence de TGF- β (données non présentées).

Une autre hypothèse serait qu'il existe une relation plus directe entre la signalisation TGF- β (canonique ou non) et la suppression de BLIMP-1. L'inhibition de BLIMP1 par TGF- β dans les LT a préalablement été décrite (313, 509). Plus spécifiquement, TGF- β inhibe l'expression de PRDM1 en augmentant l'expression du microARN, miR-23a (313, 510). Dans notre modèle, nous avons mesuré par qPCR l'expression de miR-23a dans les LT traités ou non par TGF- β . Les résultats ont montré une augmentation significative de l'expression de miR-23a uniquement dans les LT CD4⁺ traités au TGF- β après 72h de culture (données non présentées). Ce qui suggère que dans notre modèle, l'inhibition de BLIMP1 par TGF- β pourrait aussi être médiée par une augmentation de miR-23a, au moins dans les CD4⁺. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions inhiber miR-23a dans nos cultures en utilisant des oligonucléotides anti-sens spécifiques à miR-23a et observer l'effet de cette inhibition sur l'expression de BLIMP1 en présence de TGF- β .

Enfin, l'expression d'ID3 pourrait également être directement induite par TGF- β . Il a en effet déjà été démontré que le TGF- β pouvait induire l'expression d'ID3 dans des progéniteurs

lymphoïdes B et T, de façon dépendante de Smad3 (511). Cependant, dans d'autres cellules non hématopoïétiques TGF- β est plutôt associé à une régulation négative d'ID3 (512, 513).

Pour vérifier si TGF- β régule directement l'expression d'ID3 dans nos cultures, il faudrait d'abord déterminer si l'effet induit par TGF- β dans notre modèle est Smad dépendant (voie canonique) ou indépendant (voies non canoniques). A cet effet, il faudrait inhiber dans nos cultures, en présence de TGF- β , individuellement et/ou simultanément, les deux facteurs de transcriptions impliqués dans la voie canonique du TGF- β , Smad2 et Smad3 et analyser l'impact de cette inhibition sur la différenciation des LT traités. Afin de déterminer le rôle spécifique de Smad3, une étude dose-réponse avec un inhibiteur pharmacologique, le SIS3, capable d'inhiber spécifiquement la phosphorylation de Smad3 et d'empêcher par conséquent la formation de l'hétérodimère Smad3/Smad4 et sa translocation au noyau (514), pourrait être réalisée. Pour ce qui est de Smad2, il n'existe pas d'inhibiteur pharmacologique pouvant spécifiquement inhiber sa phosphorylation. Son inhibition pourrait être réalisée grâce à un "knock down" génétique en utilisant des siRNA (*small interfering RNA*), par exemple, le SMARTpool: Accell SMAD2 siRNA de chez Dharmacon, conçu pour transfecter plus facilement les cellules primaires comme les LT.

Dans le cas où l'effet du TGF- β sur la différenciation des LT humains est Smad dépendant, nous pourrions vérifier si Smad2/3 peut directement se lier au promoteur du gène d'ID3 en procédant à une immunoprécipitation de chromatine (ChIP). Dans le cas contraire, il faudra déterminer quels sont les autres acteurs de la signalisation non canonique du TGF- β qui pourrait être impliqués dans son effet sur la différenciation des LT humains.

Enfin, compte tenu du rôle primordial d'ID3 dans la différenciation mémoire des LT (455, 508) et de l'augmentation significative de son expression, au niveau transcriptionnel et protéique, observée en présence du TGF- β dans notre modèle de culture, nous avons tenté de déterminer l'importance de son implication dans le phénotype mémoire induit par le TGF- β en réalisant un "*Knock Down*" génétique d'ID3 par le système siRNA (*small interfering RNA*), mais seulement sur un nombre réduit de donneurs (N=2). Les résultats obtenus ont montré que la réduction de l'expression d'ID3 induite par le siRNA-spécifique d'ID3 (d'environ 50%) dans les LT traités au TGF- β était proportionnelle à la perte du phénotype mémoire normalement induit par TGF- β (données non présentées). Ceci signifie qu'en absence d'ID3, TGF- β n'est plus en mesure de favoriser la différenciation centrale mémoire des LT humains. Bien que ces résultats soient très encourageants et qu'ils nous permettent de comprendre, au moins en partie, le mécanisme par lequel TGF- β pourrait induire son effet sur la différenciation des LT humains, il n'en reste pas moins que ces résultats sont préliminaires et qu'ils devront être confirmés sur un plus grand nombre de donneurs avant de pouvoir affirmer avec certitude le lien fonctionnel solide entre le TGF- β , ID3 et la différenciation centrale mémoire des LT humains. Une association fonctionnelle similaire entre le TGF- β et ID3 a déjà été établie chez la souris où ID3 s'est révélé important pour l'induction de l'expression de FOXP3 et la génération de LT régulateurs (Treg) après une exposition au TGF- β (515). Cependant, la relation entre TGF- β et ID3 reste complexe puisque dans un autre contexte, la combinaison de TGF- β et de l'IL-4 chez la souris entraîne une réduction de l'expression d'ID3 et favorise une différenciation Th9 des LT (450). Ceci illustre bien la nature pléiotropique du TGF- β et son effet contexte dépendant dans la régulation des LT, influencé par le statut de différenciation des LT, ainsi que l'intégration des différents signaux de co-stimulation et d'autres cytokines.

Globalement, nos résultats suggèrent que TGF- β pourrait inhiber l'expression de BLIMP1 en augmentant l'expression de miR-23a, ce qui, en contrepartie, permettrait une plus forte expression d'ID3 et favoriserait une différenciation mémoire des LT (455).

En plus du rôle prépondérant que pourraient jouer BLIMP1 et d'ID3 dans la différenciation mémoire des LT humains exposés au TGF- β , d'autres facteurs pourraient être impliqués dans ce phénotype, telle que la réduction significative de TBX21 (code pour T-bet), un régulateur crucial de la différenciation effecteur des LT (241, 274, 516), observée dans les LT traités au TGF- β , ou encore l'augmentation significative de l'expression de FOXP3, qui comme nous le discuterons plus loin, n'est pas associée à la génération de Treg dans nos cultures.

T-bet est considéré comme le régulateur principal de la différenciation des LT de type 1 (Th1/TC1). Il contrôle leur production d'IFN- γ (517) et coopère avec d'autres facteurs pour favoriser l'expression du granzyme B et de la perforine, deux autres médiateurs de la fonction effectrice des cellules T cytotoxiques (518). Des niveaux faibles ou élevés d'expression de T-bet peuvent, respectivement, favoriser la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ activés en LT effecteurs cytotoxiques transitoires ou en cellules mémoire à longue durée de vie (519). Plusieurs études ont associé une réduction de l'expression de T-bet à une différenciation mémoire des LT. De ce fait, l'inhibition de l'expression de T-bet par le TGF- β , précédemment décrite dans d'autres études (382, 386, 520) et également observée dans nos cultures, peut contribuer au phénotype mémoire induit par le TGF- β .

Plusieurs études suggèrent que FOXP3 pourrait jouer un rôle différent dans les LT conventionnels que dans les Treg (470). Elles suggèrent que FOXP3 intervient dans l'activation des LT conventionnels. En effet, il a été démontré que FOXP3 est induit par l'engagement du TCR, et que les LT qui ont régulé positivement l'expression de FOXP3 deviennent moins réactifs (521), ce qui suggère que l'induction de FOXP3 sert d'interrupteur pour inhiber l'activation des lymphocytes T (522). Et comme il a été démontré que les pics d'expression de FOXP3 sont observés 5 à 7 jours après la stimulation du TCR, avec plus de 90% des cellules exprimant le FOXP3 (521), comme nous l'avons, nous aussi, observé dans nos cultures, cela soutiendrait l'hypothèse selon laquelle le FOXP3 induirait une rétroaction négative au pic d'activation des LT (522). Cette hypothèse est renforcée par la découverte que FOXP3 inhibe la transcription d'un certain nombre de gènes qui sont également des cibles pour le facteur de transcription NFATc2, élément clé de la signalisation du TCR (523, 524). En effet, l'engagement du TCR par son antigène spécifique conduit à une série d'événements biochimiques qui aboutissent, notamment, à la translocation nucléaire de NFATc2 (NFAT1) qui, en coopération avec NFκB et AP-1 (Fos / Jun), peut activer de nombreux gènes au cours de l'activation lymphocytaire, dont l'IL-2 (523, 525). En plus de réguler l'expression des gènes impliqués dans la fonction effectrice des lymphocytes T, NFATc2 peut également induire la transcription de FOXP3 en réponse à l'activation du TCR (526). FOXP3 est alors capable de réprimer la transcription de l'IL-2 et de NFATc2, formant ainsi une boucle de rétroaction négative pour l'activation des LT. Cette capacité régulatrice de FOXP3 se justifie par sa capacité à interagir physiquement avec le NFAT pour former un complexe coopératif nécessaire pour réprimer l'expression de la cytokine IL-2 et réguler positivement l'expression des marqueurs Tregs, CTLA4 et CD25, ainsi que pour leur conférer leur fonction suppressive

(524). Enfin, une étude a montré que l'inhibition de l'interaction de FOXP3/NFAT permet de rétablir l'expression du CD40L sur les lymphocytes T effecteurs ainsi que l'augmentation de leur prolifération et la production des cytokines IL-2, IFN- γ , IL-6 et IL-17 en réponse à une stimulation du TCR (527). Une autre étude plus récente a montré que FOXP3 inhibe la prolifération et la production des cytokines dans les LT humains conventionnels et qu'il inhibe la production d'IFN- γ dans les Th17 (470). L'ensemble de ces données laisse entrevoir la possibilité que TGF- β pourrait induire une différenciation mémoire des LT humains activés en atténuant le signal TCR par le biais du FOXP3, toujours selon le modèle de différenciation progressif des LT. Toutefois, il faut noter que dans nos cultures, seule l'expression génique de FOXP3 est augmentée par TGF- β . Son expression au niveau protéique est identique en présence ou en absence de TGF- β . Ceci implique que des expériences supplémentaires sont requises pour déterminer si FOXP3 est nécessaire pour induire le phénotype mémoire des LT humains traités par TGF- β . Par exemple, par la réalisation d'un "*knock down*" génétique de FOXP3 par un système de siRNA (*small interfering RNA*) dans les LT traités par TGF- β .

L'effet du TGF- β sur la différenciation des LT humains est probablement le résultat de la convergence de plusieurs mécanismes à la fois. Toutefois, compte tenu du rôle clé de BLIMP1 (505) et d'ID3 (455) dans la différenciation effectrice et mémoire des LT, respectivement, ainsi que de nos résultats d'expression génique et protéique et de notre étude fonctionnelle (KO ID3), nous privilégions la piste BLIMP/ID3 comme étant la prédominante dans notre système de culture.

1.3 L'effet du TGF- β est indépendant de la prolifération et améliore la polyfonctionnalité des LT humains

Le TGF- β est connu pour inhiber la prolifération des cellules T primaires (466) et peut bloquer la production de l'IL -2 dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (528). Le TGF- β peut également inhiber la fonction effectrice des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) en réduisant l'expression de l'interféron IFN- γ , de la perforine et du granzyme (529-531).

Paradoxalement et en dépit des nombreux effets négatifs associés au TGF- β , il a été rapporté que ce dernier avait un effet limité sur la prolifération et la fonction des LT différenciés, effecteurs ou mémoires (466, 529, 532) et qu'il pouvait améliorer la prolifération et la fonction de certaines sous-populations de lymphocytes T (533, 534). D'autre part, plusieurs études ont montré que l'effet négatif du TGF- β sur la prolifération et la différenciation des CTL pouvait être inversé par l'addition de molécules de co-stimulation, telles que le CD28 ou le 4-1BB (368, 535, 536), ou de cytokines, telles que l'IL-2 ou IL-6 (529, 537), ou par l'élimination du TGF- β de la culture (538). Enfin, le TGF- β , associé à des molécules de co-stimulation ou à des cytokines, peut également favoriser la survie des lymphocytes T effecteurs/mémoire et peut bloquer l'AICD (*Activation-Induced Cell Death*) dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (533, 534, 539, 540).

L'ensemble de ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'effet du TGF- β sur la différenciation, la prolifération et la survie des cellules T serait dépendant du stade de différenciation de ces dernières et de la présence d'autres signaux régulateurs dans le milieu environnant (359).

Dans notre étude, nous avons démontré que l'exposition des LT au TGF- β n'avait pas d'effet sur leur prolifération ou leur viabilité. D'un point de vue fonctionnel, nous avons démontré que même si le TGF- β réduisait la production d'IFN- γ par les LT CD4⁺ et CD8⁺, il augmentait en contrepartie leur production d'IL-2 et de TNF- α , ainsi que leur polyfonctionnalité, ce qui a été associé à une meilleure réponse immunitaire contre les pathogènes (541) et qui serait souhaitable dans le contexte d'une réponse anti-tumorale. De plus, la production d'IL-2, de TNF- α et moindrement d'IFN- γ par les LT correspond au profil cytokinique associé au LT mémoire, contrairement aux LT différenciés de façon terminale qui produisent principalement de l'IFN- γ (207). Des résultats similaires ont été observés dans des cultures de TILs stimulés *ex-vivo* par le TGF- β durant la phase rapide d'expansion (REP-*Rapid Expansion Procedure*) en présence de cellules nourricières, d'anti-CD3 (OKT3) et d'IL-2 (475). En effet, dans cette étude les auteurs ont observé que le traitement des TILs par le TGF- β au début du REP permettait de favoriser l'expansion des CD8⁺ spécifiques de l'antigène et d'améliorer leur fonctionnalité et leur réponse anti-tumorale *in-vitro*. En notant qu'à la différence de notre étude où nous avons testé l'effet du TGF- β sur des LT périphériques non activés (naïfs ou mémoire), les TILs sont des LT activés, généralement épuisés, ce qui suggère que l'effet bénéfique du TGF- β pourrait être exploité dans différents protocoles d'IA.

Ces résultats sont d'autant plus intéressants lorsque l'on sait que l'une des principales limitations à contourner pour améliorer l'efficacité de l'IA est de parvenir à générer un nombre suffisant de LT pour induire un effet thérapeutique tout en limitant leur différenciation terminale. En effet, les études ont montré que l'obtention d'une réponse clinique est corrélée au transfert d'un grand nombre de cellules et au transfert de cellules qui ont un phénotype peu différencié (273). Dans la même ligne, notre étude démontre qu'il est possible de découpler la

prolifération de la différenciation des LT, longtemps considérés comme indissociables, en traitant *ex-vivo* les LT avec du TGF- β , qui favorise une différenciation centrale mémoire des LT sans altérer leur prolifération, leur viabilité ni leur fonctionnalité.

1.4 TGF- β n'induit pas la génération de Treg ni de Th17

Bien que le TGF- β soit connu pour moduler à la fois le développement et les fonctions régulatrices des LT régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (497, 542, 543), l'addition du TGF- β dans nos cultures n'a pas abouti à la génération de Tregs. Ce qui concorde avec d'autres études ayant montré que le TGF- β seul ne peut induire la différenciation des Treg (468, 469). En effet, malgré une augmentation significative de l'expression génique de FOXP3, codant pour le facteur de transcription associé au Treg, dans les LT traités au TGF- β comparés aux contrôles non traités, son expression au niveau protéique est similaire dans les deux conditions. Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, l'expression de FOXP3 dans les LT humains n'est pas toujours associée aux Tregs, mais elle peut aussi être transitoirement induite dans les LT conventionnels à la suite d'une stimulation du TCR (468, 521, 544, 545). Les principales différences entre FOXP3 dans les Tregs et les LT conventionnels sont son niveau d'expression et sa stabilité. Dans les Tregs, la région TSDR du promoteur de *FOXP3* est déméthylée, ce qui permet une expression élevée et stable de *FOXP3* (546). A l'inverse, dans les cellules T conventionnelles, la TSDR est méthylée, ce qui entraîne une expression transitoire de *FOXP3* et qui n'atteint jamais les mêmes niveaux d'expression que dans les Tregs (468, 521, 547). De plus, l'expression transitoire de *FOXP3* dans les T conventionnels n'empêche pas la production de cytokines et/ou ne leur confère pas de capacité suppressive, bien que cela ait fait l'objet de controverses (468, 521, 544, 545, 547-549). En accord avec ces données, l'exposition des LT

au TGF- β dans nos cultures n'a pas conduit à une déméthylation de la région TSDR du promoteur de *FOXP3*, contrairement à ce qu'on a observé dans des Tregs isolés à partir des mêmes donneurs. D'autre part, notre test de suppression allogénique n'a révélé aucune activité suppressive des LT exposés au TGF- β comparés aux Tregs isolés à partir des mêmes donneurs testés, et aucune production d'IL-10 n'a été détectée.

A l'instar de *FOXP3*, *IKZF2* (code pour Helios) et *IKZF4* (code pour Eos), deux autres gènes associés aux Tregs et dont l'expression est significativement augmentée dans les LT traités au TGF- β , peuvent être eux aussi exprimés dans les LT conventionnels activés (550, 551).

De même, bien que l'expression génique de ROR γ t, facteur de transcription associé au Th17, ait été significativement augmentée par TGF- β , tel que déjà décrit dans la littérature (382, 395), nous n'avons pas détecté la présence d'IL-17 dans les surnageants de cultures traitées au TGF- β . En notant que FOXP3 antagonise la production de l'IL-17 et la différenciation Th17 en interagissant avec ROR γ t (395).

1.5 TGF- β améliore la prolifération, la persistance et la réactivité des LT humains *in vivo* dans un modèle de GVHD et un modèle tumoral

Plusieurs études précliniques ont montré que le transfert adoptif de LT peu différenciés (Tscm et Tcm) amenait une meilleure réactivité *in-vivo* (207). Ceci a été associé à leur capacité d'auto-renouvellement, de persistance à long terme et de prolifération *in vivo*. En accord avec ces données, le TA de LT exposé *ex-vivo* au TGF- β dans des souris immunodéficiences (NSG- NOD-scid IL2r γ null) a montré une meilleure réactivité *in-vivo* de

ces cellules, qui ont entraîné l'apparition d'une GVHD (*Graft Versus Host Disease*) plus rapide que les LT non exposés au TGF- β . Les cellules traitées au TGF- β ont également démontré une meilleure capacité à proliférer et à persister *in-vivo* comparées aux contrôles non traités, ce qui pourrait expliquer leur efficacité à induire une GVHD. Toutefois, nous n'avons pas testé la capacité des LT exposés au TGF- β à s'auto-renouveler. La réalisation de greffes sériées pourrait nous permettre de répondre à cette question. Dans cette perspective, nous pourrions injecter des LT exposés ou non au TGF- β une première fois dans des souris NSG. Par la suite, ces cellules seront à nouveau isolées à partir des organes lymphoïdes des premières souris, et ce, avant l'apparition d'une GVHD trop sévère, afin de les réinjecter dans un deuxième groupe de souris. Cette opération sera renouvelée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus suffisamment de cellules dans l'un des deux groupes. Si les LT traités au TGF- β ont une meilleure capacité d'auto-renouvellement, elles devraient disparaître moins rapidement que les contrôles.

Enfin, nous avons également démontré que l'exposition de cellules CAR T (spécifique à BCMA- *B Cell Maturation Antigen*) au TGF- β durant l'étape d'activation *ex-vivo*, leur conférait une meilleure réactivité anti-tumorale *in-vivo* dans un modèle de myélome. Ces résultats montrent qu'une brève exposition des LT au TGF- β durant leur phase d'activation *ex-vivo* leur confère des propriétés de cellules mémoires qui se traduisent par une meilleure efficacité thérapeutique *in-vivo*.

Dans la biologie du LT, le TGF- β a d'abord été décrit comme un facteur inhibiteur, notamment dans le microenvironnement tumoral où, produit en excès, il exerce un effet suppresseur sur les LT infiltrant la tumeur. Notre étude a permis de révéler un nouvel aspect du rôle de cette cytokine dans la différenciation mémoire des LT. Cette nouvelle propriété du

TGF- β est pertinente dans le contexte de l'immunothérapie adoptive puisque elle pourrait être exploitée pour nous permettre de générer des LT de meilleure qualité et ainsi améliorer leur efficacité thérapeutique.

1.6 Cibler TGF- β en immunothérapie

Comme nous l'avons précédemment mentionné, le TGF- β agit comme un suppresseur de tumeur puissant en induisant l'inhibition de la croissance et l'apoptose des cellules précancéreuses. Par la suite, les mutations qui éliminent ou dissocient la voie du TGF- β de l'apoptose convertissent non seulement ces cellules précancéreuses en cellules malignes, mais leur permettent également d'utiliser le TGF- β pour créer un microenvironnement immunosuppresseur et favoriser la progression de la tumeur et les métastases.

Le TGF- β favorise la progression tumorale notamment, en affectant différents acteurs du SI. Il inhibe directement l'activation des lymphocytes T et favorise globalement leur différenciation en cellules immunorégulatrices. De plus, le TGF- β accentue la suppression de la réponse T indirectement en inhibant la maturation des cellules dendritiques, des macrophages et des neutrophiles, et en favorisant leur polarisation en cellules anti-inflammatoires, limitant ainsi la présentation antigénique et la sécrétion de cytokines promotrices de la voie Th1 (354, 409, 423). Un autre mécanisme récemment identifié par lequel le TGF- β inhibe la réponse anti-tumorale est l'exclusion des LT du centre de la tumeur (433, 434). En effet, Tauriello et ses collègues ont montré que des taux élevés de TGF- β produits par les fibroblastes associés aux tumeurs (CAF- *cancer-associated fibroblasts*) ainsi que par d'autres cellules du microenvironnement tumoral, entraîne l'exclusion des LT CD4⁺ et

CD8⁺ du centre de la tumeur, limitant ainsi l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (434).

Plusieurs études ont montré l'évidence que l'ablation génétique de différents composants de la voie de signalisation du TGF- β dans différents types de cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺, les cellules NK ou les cellules dendritiques, entraîne des réponses anti-tumorales robustes dans des modèles précliniques de cancer (552). Ces études, combinées aux preuves accablantes selon lesquelles les tumeurs au stade avancé exploitent le TGF- β pour l'invasion et les métastases, ont suscité la mise au point de plusieurs approches visant à bloquer la signalisation du TGF- β dans le cancer et dont certaines sont actuellement testées en clinique(553, 554). Bien que l'utilisation du blocage du TGF- β en monothérapie entraîne des réponses significatives dans certaines études, celles-ci restent tout de même modestes.

Des thérapies de combinaisons associant l'inhibition de la signalisation du TGF- β avec différentes approches d'immunothérapie ont été envisagées afin d'en améliorer l'efficacité. Par exemple, des études précliniques très récentes suggèrent que l'effet des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires pourrait être potentialisé par leur combinaison avec un inhibiteur de la signalisation du TGF- β , tel que Galunisertib (LY2157299), une petite molécule qui inhibe l'activité kinase de TGFBR1, ce qui améliore la réponse anti-tumorale (433, 434, 555, 556). Ainsi, la thérapie de combinaison Galunisertib/PDL1 a permis d'induire une réponse immunitaire puissante, avec une augmentation de l'expression de T-BET et d'IFN- γ dans les LT CD4⁺ et une production élevée de granzyme B par les LT CD8⁺, entraînant ainsi l'éradication de la tumeur (434). Sur la base de ces découvertes, plusieurs essais cliniques

combinant l'inhibition du TGF- β à l'inhibition des points de contrôles immunitaires sont actuellement en cours.

Une autre approche intéressante est basée sur l'utilisation d'un anticorps bifonctionnel comprenant un anticorps ciblant le CTLA4 ou PDL1 fusionné à la partie extracellulaire du récepteur TGFBR2, ce qui permet de désensibiliser les cellules cibles dans le microenvironnement tumoral à la fois à l'effet autocrine et paracrine du TGF- β (557). La molécule anti-CTLA4-TGFBR2 a permis de réduire l'accumulation de Treg dans des souris immunodéficientes NSG (*NOD scid gamma*) porteuses d'un mélanome dérivé du patient et présentait une efficacité anti-tumorale accrue par rapport à la monothérapie standard anti-CTLA4. De même, l'anti-PDL1-TGFBR2 a induit une réponse anti-tumorale plus prononcées que les anticorps anti-PD-L1 (557). L'anticorps chimérique anti-PDL1-TGFBR2 est actuellement testé dans des essais cliniques de phase 1 pour plusieurs indications (552).

Par ailleurs, il a été démontré que le blocage de la signalisation du TGF- β pouvait également améliorer l'efficacité de l'IA. Par exemple, le transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques dans un modèle de cancer de la prostate augmente les réponses anti-tumorales grâce à l'expression d'un récepteur dominant négatif, dnTGFBR2 (221, 558). Cette stratégie a récemment été testée en clinique chez des patients atteints d'un lymphome Hodgkinien associé au virus Epstein-Barr chimio-réfractaire (439). Les auteurs ont rapporté que des cellules CD8⁺ autologues dirigées contre les antigènes tumoraux dérivés du virus d'Epstein-Barr, génétiquement modifiées pour exprimer un TGFBR2 dominant négatif, ont entraîné une réponse complète chez quatre patients sur sept. Bien que le nombre de patients soit réduit dans cette étude, celle-ci suggère la possibilité d'améliorer l'efficacité de l'IA grâce à la

désensibilisation des LT transférés au TGF- β . Cette stratégie pourrait être largement applicable à un large éventail d'IA.

Nous l'aurons donc compris, les stratégies actuelles qui ciblent la voie du TGF- β en immunothérapie, tentent de l'inhiber afin d'éviter ces effets délétères sur la réponse anti-tumorale. Cependant, notre étude a permis de révéler une nouvelle facette du rôle du TGF- β dans la biologie du LT et de son utilisation potentielle en IA. Cette dualité du rôle du TGF- β en tant qu'inhibiteur de la réponse T *in-vivo* dans le microenvironnement tumoral *versus* un inducteur de la mémoire T *ex-vivo*, témoigne de sa pléiotropie et de son effet contexte-dépendent et laisse entrevoir la possibilité d'exploiter ces différentes facettes en IA pour en améliorer l'efficacité. Ainsi, il ne serait pas saugrenu d'envisager une thérapie de combinaison associant le transfert adoptif de LT exposés *ex-vivo* au TGF- β , pour en favoriser la différenciation en LT mémoire ayant un meilleur potentiel thérapeutique, avec une inhibition systémique du TGF- β (avec un anticorps bloquant (1D11), par exemple) qui permettrait de neutraliser le TGF- β présent en excès dans le microenvironnement tumoral et d'inhiber ces effets délétères à la fois sur les LT transférés, mais aussi sur les autres cellules du SI.

Une autre stratégie consisterait à modifier génétiquement des LT pour exprimer un dnTGFBR2 conditionnel, inductible uniquement dans le microenvironnement tumoral, par exemple, par la présence de facteurs d'hypoxie (exp. HIF-1 α). Ceci permettrait de faire en sorte que les LT soient sensibles au TGF- β durant leur phase d'activation *ex-vivo*, ce qui favoriserait leur différenciation mémoire, puis une fois transférées, ces cellules deviendront désensibilisées au TGF- β intra-tumoral, ce qui potentialiserait leur cytotoxicité et leur réponse

anti-tumorale. Cette stratégie pourrait aussi bien être testée sur des lignées antigène-spécifiques que sur des CAR-T.

1.7 TGF- β induit l'expression du CD103 et favorise l'expression de gènes associés au Trm chez l'humain

En plus d'instruire un programme transcriptionnel associé au Tcm, nos résultats de séquençage ont révélé que le TGF- β induisait une forte expression du gène *ITGAE* qui code pour l'intégrine CD103. L'augmentation de l'expression d'*ITGAE* corrélait avec une augmentation de plus de 50% de l'expression du CD103, aussi bien dans les LT activés de façon non spécifique que dans les lignées anti-EBNA1. Ces résultats sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature, puisque il a déjà été démontré qu'*ITGAE* était une cible directe du TGF- β dans les Trm (559). Par ailleurs, TGF- β a positivement régulé l'expression d'autres gènes codant pour des molécules ou des facteurs de transcription associés à un phénotype de rétention tissulaire, telle que la molécule d'adhésion *Chd1* (code pour l'E-cadhérine), des régulateurs de la signalisation des protéines G (*RGS1*, *RGS16* et *RGS19*), le *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AhR), ainsi que *Notch* (codant pour le facteur de transcription NOTCH1). En contrepartie, nous avons observé une diminution de l'expression du gène *Klf2* (codant pour le facteur de transcription KLF2), *Tbx21* (codant pour le facteur de transcription T-bet) et *eomes* (codant pour le facteur de transcription EOMES), habituellement inhiber dans les Trm. Ces résultats suggèrent que le l'exposition des LT *ex-vivo* au TGF- β induit l'expression d'un profil génétique associé au moins en partie au Trm, ce qui pourrait favoriser la rétention de ces cellules dans les tumeurs. Le transfert adoptif de LT ayant des propriétés de Trm peut améliorer l'efficacité de l'IA. En effet, une étude récente ayant identifié le facteur de

transcription Runx3 comme étant essentiel pour l'établissement des Trm dans divers tissus normaux et dans le cancer, a également démontré, dans un modèle préclinique de mélanome, que le transfert adoptif de TIL CD8⁺ dépourvus de Runx3 et ne présentant pas de phénotype Trm a entraîné une croissance tumorale incontrôlée et une faible survie des souris traitées. En revanche, le TA de LT CD8⁺ surexprimant Runx3, a significativement inhibé la croissance tumorale et a amélioré la survie des souris traitées (248). De même, le TA de LT déficients en CD103 a permis de confirmer le rôle des Trm dans le contrôle de la progression tumorale (560). Ceci soutient l'hypothèse que le TA de LT préalablement traités au TGF- β et exprimant des propriétés de Trm pourrait entraîner une meilleure réponse anti-tumorale. Ces observations constituent les prémices de notre deuxième projet.

2. TGF- β favorise la migration et la rétention intra-tumorale des LT

L'efficacité de l'immunothérapie du cancer repose principalement sur l'obtention d'une réponse effectrice forte et durable des LT cytotoxiques dans la tumeur. Un des obstacles majeurs à la réalisation de cet objectif est la migration inefficace des LT vers le site de la tumeur.

Dans notre deuxième étude, nous avons exploré le potentiel du TGF- β à améliorer la migration et la rétention des LT-OT-I stimulés *ex-vivo* vers le site de la tumeur, dans un modèle murin de carcinome pulmonaire exprimant le peptide OVA (*Lewis Lung Carcinoma-LLC-OVA*). Nos données ont montré que le traitement *ex-vivo* des LT-OT-I au TGF- β augmente l'expression de plusieurs molécules associées à un phénotype de migration et de

réretention tissulaire, telles que le CXCR3, le CD103 et plus modestement le CD69 et réduit en contrepartie l'expression du récepteur de "homing" CD62L. L'inhibition du CD62L par le TGF- β a déjà été observée (462), mais est en contradiction avec nos résultats chez l'humain (voir article 1). Cette divergence peut être liée à des différences dans la conception des expériences (exp. Type de stimulation, force du signal TCR,..) ou à des différences entre l'humain et la souris. De même l'induction de l'expression du CXCR3 par le TGF- β a déjà été observée dans les LT murins (400, 561), les NK humains (403) et les LT CD8⁺ dérivés du sang de cordon (562). Enfin, le TGF- β est connu pour induire l'expression du CD103 lors de l'activation des LT en régulant directement la transcription de son gène, *ITGAE* (559, 563, 564).

Par la suite, un test compétitif de migration en Transwell a permis de montrer que les LT-OT-I traités *ex-vivo* au TGF- β ont une meilleure capacité à migrer en réponse aux ligands recombinants du CXCR3 et que cette migration est dépendante des récepteurs associés aux protéines G_{ia} en général et plus spécifiquement du CXCR3. De plus, les LT-OT-I exposés *ex-vivo* au TGF- β ont aussi montré une meilleure capacité à migrer en réponse aux surnageants des tumeurs LLC-OVA. Bien qu'aucun test n'a encore été réalisé pour mesurer l'expression des ligands du CXCR3 par les tumeurs LLC-OVA, la perte du potentiel migratoire des LT-OT-I traités *ex-vivo* au TGF- β par rapport aux contrôles non traités en réponse aux surnageants des LLC-OVA, après leur prétraitement avec un anticorps bloquant spécifiquement le CXCR3, suggère la présence de ces chimiokines dans les surnageants utilisés. De plus, les résultats du test de migration compétitif *in vivo* ont révélé que, 3 et 72 heures après leur transfert adoptif, les LT-OT-I traités au TGF- β ont migré plus efficacement vers les rates et les tumeurs LLC-OVA comparés aux contrôles non traités. L'infiltration d'un plus grand nombre de LT-OT-I

traités au TGF- β dans les tumeurs après 3h du TA est probablement due à une meilleure capacité des LT-OT-I traités au TGF- β à migrer vers la tumeur, puisque nous pensons que cette durée de temps n'est pas suffisante pour permettre la mise en place d'autres processus (prolifération *in situ*, survie, rétention,..) pouvant influencer l'étendue de l'infiltration tissulaire. La migration précoce des LT-OT-I traités au TGF- β pourrait être due, là aussi, à une plus forte expression du CXCR3 par ces cellules. Cependant, pour le vérifier il sera nécessaire de refaire les mêmes tests après administration *in vivo* d'un anticorps bloquant spécifiquement le CXCR3 aux souris porteuses de tumeurs LLC-OVA.

Les chimiokines et leurs récepteurs représentent un des axes majeurs qui contrôlent le recrutement des LT cytotoxiques (CTL) au site de la tumeur et orchestrent la réponse anti-tumorale (565, 566). Parmi eux, le CXCR3 et ces ligands, CXCL9 et CXCL10 (inductibles par l'IFN- γ), ont été décrits comme jouant un rôle crucial dans l'immunité anti-tumorale (330, 561, 567, 568). Leur expression dans le microenvironnement tumoral est associée à une importante infiltration de la tumeur par les LT effecteurs et à un bon pronostic chez des patients atteints d'un cancer colorectal ou d'un mélanome (486-489). Dans une étude récente, Mikuchi et ses collaborateurs ont démontré avec élégance, dans des modèles murins et humains de mélanome, que la signalisation en aval du CXCR3 était un point de contrôle essentiel et indispensable pour que les LT CD8⁺ spécifiques aux tumeurs transférés circulent dans le système vasculaire tumoral (561). En accord avec cette étude, les résultats obtenus suite au test de migration *in vivo* suggèrent que le TGF- β améliore la migration des LT-OT-I transférés vers le site de la tumeur en induisant l'expression du CXCR3. Cette observation est soutenue par une récente étude où les auteurs ont étudié le rôle du TGF- β dans la formation des Trm dans le rein. Leurs résultats ont montré que le TGF- β favorise la formation de LT résidents

dans le rein en améliorant l'entrée tissulaire des LT effecteurs. Dun point de vue mécanistique, le TGF- β induit l'expression des ligands des E et P sélectines et du CXCR3 qui coopèrent pour faciliter la migration transendothéliale des LT CD8⁺ effecteurs dans le rein (569). Plus tôt, le même groupe a montré chez la souris qu'une signalisation continue du TGF- β était requise pour maintenir l'expression du CXCR3 sur les LT CD8⁺ mémoires circulants (569).

Après 72h du TA, l'infiltration de la tumeur par un plus grand nombre de LT-OT-I traités au TGF- β a pu faire intervenir d'autres processus, tels que la rétention des LT dans la tumeur par l'interaction du CD103, fortement exprimé par ces cellules, à son ligand, l'E-cadhérine, exprimé par les tumeurs LLC-OVA. Bien qu'un rôle du CD103 dans la migration des LT vers les épithéliums ait déjà été suggéré (570, 571), les résultats de plusieurs études indiquent plutôt un rôle important du CD103 dans la rétention des LT dans les tissus épithéliaux (572). En effet, le CD103 induit l'arrêt des LT en interagissant avec l'E-cadhérine exprimée dans les tumeurs épithéliales (573). L'infiltration de la tumeur par un nombre important de LT CD8⁺CD103⁺ a été associée à une meilleure survie des patients atteints de carcinomes ovariens (229) ou pulmonaires (228), suggérant ainsi l'implication du CD103 dans le recrutement des LT dans l'épithélium tumoral. Au contraire, l'accumulation préférentielle de LT CD8⁺CD103⁻ dans le stroma tumoral et associé à une réponse anti-tumorale inefficace (574, 575).

Bien que cet aspect n'ait pas encore été abordé dans notre étude, il est reconnu qu'en plus de favoriser la rétention des LT dans la tumeur, le CD103 peut réguler d'autres fonctions des LT. En effet, dans le microenvironnement tumoral, il a été démontré que le rôle du TGF- β ne se limitait pas à induire l'expression de l'intégrine CD103, mais il régule également son

activation *via* l'initiation de la signalisation des voies ILK et AKT/PKB, Ce qui renforce l'interaction CD103-E-cadhérine, et contribue à initier la signalisation " outside-in" du CD103, favorisant ainsi la mobilité, la migration et la cytotoxicité des LT (574). De ce fait, le CD103 régule non seulement le recrutement et l'adhésion des LT à l'épithélium tumoral, mais aussi la prolifération, la sécrétion des cytokines, la maturation de la synapse immunologique et la réponse cytotoxique des LT vis-à-vis des tumeurs épithéliales (573, 576-579). Des expériences complémentaires (exp.tests de cytotoxicité *in vivo* et *in vitro*,...) devront être effectuées afin de vérifier si le CD103 induit par le TGF- β entraîne des effets similaires dans notre système.

A la suite du test de migration *in vivo*, nous avons également observé une plus grande proportion de LT-OT-I traités au TGF- β dans la rate, après 3 et 72h du TA. Ceci peut être expliqué par le fait que ces cellules expriment plus fortement le récepteur de chimiokine, CCR7, qui en réponse à ses ligands, CCL19 et CCL21, permettrait de les recruter vers la rate (580, 581). De même, bien que modeste, une plus forte expression du CD69 par les LT-OT-I traités au TGF- β , pourraient empêcher leur exclusion de la rate *via* l'inhibition du récepteur d'exclusion, *Sphingosine 1-phosphate receptor-1* (S1P₁) (227). Enfin, le CXCR3 plus fortement exprimé par les LT-OT-I traités au TGF- β peut participer à leur migration vers la rate, puisque celui-ci peut se lier au CCL21 produit dans la zone T de la rate (582). De plus, une étude dans un modèle de granulomatose hépatique chez la souris a montré que l'induction immédiate de l'expression du CXCR3 durant la phase d'activation des LT dans les organes lymphoïdes secondaires coïncide avec une augmentation de la production de ses ligands, CXCL9 et CXCL10, par les DC matures. Les LT activés sont ainsi séquestrés jusqu'à 4 jours dans les ganglions drainant avant d'être recrutés dans les tissus périphériques. Bien que cette étude ne soit pas directement liée à nos observations, ces données pourraient laisser entrevoir

un rôle potentiel du CXCR3 dans la rétention des LT dans la rate les premiers jours suivant leur transfert.

Enfin, malgré une meilleure infiltration des tumeurs LLC-OVA par les LT-OT-I traités au TGF- β comparé aux contrôles non traités, cela n'a pas suffi à éliminer ou à ralentir durablement la croissance tumorale. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la faible efficacité thérapeutique des LT-OT-I infiltrant la tumeur, par exemple, l'inhibition de la réponse anti-tumorale par le microenvironnement immunosuppresseur de la tumeur ou une faible expression des ligands de CXCR3 dans le microenvironnement tumoral. Le ralentissement de la progression tumorale observé à des temps précoces dans le groupe ayant reçu des LT-OT-I traités au TGF- β , nous laisse une petite fenêtre pour intervenir et bonifier notre stratégie thérapeutique en associant le traitement *ex-vivo* des LT au TGF- β à d'autres stratégies thérapeutiques qui par un effet synergique pourraient améliorer l'efficacité thérapeutique des LT infiltrant la tumeur.

Dans un premier temps, l'expression des ligands du CXCR3 dans le microenvironnement tumoral pourrait être amplifiée par différentes stratégies. En effet, l'expression des ligands du CXCR3 est variable d'une tumeur à l'autre (487, 488). Plusieurs stratégies ont déjà été envisagées pour booster leur production dans le microenvironnement tumoral et favoriser le recrutement des LT effecteurs. Parmi elles, des études précliniques ont montré que l'administration des ligands de TLR (*Toll like receptors*) (CpG ou poly I:C) ou d'IFN- α a permis d'induire la production des ligands de CXCR3 par les cellules stromales (fibroblastes, monocytes ou leucocytes CD45⁺) du microenvironnement tumoral (583, 584). D'autre part, le traitement par des agents chimiothérapeutiques peut aussi avoir des effets

similaires. Une étude sur un modèle préclinique de mélanome ainsi que chez des patients atteints de mélanomes cutanés, a montré que le traitement par le cisplatine, le témozolomide et le dacarbazine, stimule la production des ligands du CXCR3, favorisant ainsi le recrutement des LT CD8⁺ dans les tumeurs et a permis le contrôle des tumeurs et la survie des patients (330). D'autres stratégies, telles que l'utilisation de modulateurs épigénétiques (585, 586), l'injection intra-tumorale de CXCL10 recombinant (587) ou d'adénovirus codant pour CXCL10 (588), contribueraient également à améliorer l'infiltration des LT CD8⁺ et au rejet de la tumeur.

Ainsi, la combinaison de notre stratégie thérapeutique avec, par exemple, un agent chimiothérapeutique pourrait améliorer l'infiltration de la tumeur par les LT-OT-I transférés. En effet, bien que l'infiltration des LT-OT-I exposés au TGF- β dans les tumeurs LLC-OVA ait été meilleure après 3 et 72h, celle-ci devenait plus modeste à la fin de l'expérience.

Un autre axe intéressant à explorer pour améliorer l'efficacité thérapeutique de notre stratégie est celui du blocage des points de contrôle "*checkpoint inhibitors*", tels que le programmed death-1 (PD-1)/PD-1 ligand (PDL1) et le cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4). En effet, au cours de la dernière décennie, le blocage des "*checkpoint inhibitors*" est devenu une approche thérapeutique anticancéreuse très prometteuse qui induit des réponses anti-tumorales remarquables avec des effets secondaires limités dans de multiples cancers (589). Les inhibiteurs de points de contrôle (exp. anti-PD-1 ou anti-PD-L1) agissent en bloquant, par exemple, la liaison de la protéine PD-L1, présente sur les cellules tumorales, au récepteur PD-1 exprimé par les LT, entraînant ainsi une restauration de la fonction des LT, qui pourront ensuite attaquer la tumeur et l'éliminer. De plus, les résultats de

plusieurs études suggèrent que la signalisation PD-L1/PD-1 pourrait induire l'expression de plusieurs chimiokines et de leurs récepteurs, en particulier l'axe du CXCR3-et ses ligands. En effet, une étude a déjà montré que le blocage de PD-1 *in vivo*, dans le contexte d'une immunothérapie adoptive, ralentit la progression tumorale en augmentant la prolifération et le recrutement des LT transférés sur le site de la tumeur, en plus d'induire une production accrue d'IFN- γ et du CXCL10 (329). Par ailleurs, une autre étude a montré qu'en absence de l'axe CXCR3-et ses ligands, le blocage *in-vivo* de PD-1 ne parvient pas à réduire la croissance tumorale (485). Enfin, Curran et ses collaborateurs ont montré que, dans un modèle de mélanome murin, le blocage combiné de PD-1 et de CTLA4 permettait également d'augmenter la production d'IFN- γ et par conséquent le recrutement de LT activés vers le site de la tumeur (590). Ces données suggèrent qu'une thérapie de combinaison associant un TA de LT traités *ex-vivo* au TGF- β avec un blocage de l'axe PD-1 (et/ou d'autres "*checkpoint inhibitor*") pourrait être envisagée afin d'améliorer l'efficacité de la réponse anti-tumorale obtenue dans nos expériences. L'effet synergique de ces deux stratégies pourrait enclencher une boucle rétroactive positive qui permettrait d'améliorer à la fois le recrutement, la rétention ainsi que la cytotoxicité des LT transférés.

Conclusion

L'immunothérapie adoptive constitue une thérapie prometteuse pour le traitement des cancers hématologiques et les mélanomes avancés. Cependant, malgré les progrès fulgurant dans le domaine, de nombreux obstacles doivent être franchis avant que l'IA ne devienne un traitement de première ligne contre le cancer. Les travaux de cette thèse permettent d'apporter une petite pierre à l'édifice colossal qu'il nous reste à bâtir dans les prochaines années.

Notre étude a permis de révéler une nouvelle facette du rôle du TGF- β dans la biologie du LT, qui s'ajoute à une longue liste d'effets, jusqu'à là redoutés et combattus dans le domaine de l'immunothérapie anticancéreuse. Notre travail a montré que, dans certaines conditions, le TGF- β pouvait favoriser, d'une part, la différenciation centrale mémoire des LT, et d'autre part, leur capacité migratoire et d'infiltration au site de la tumeur. Nos trouvailles réhabilitent l'image du TGF- β et montre que si l'on sait comment et quand l'utiliser, il pourrait servir à améliorer l'efficacité de l'IA.

D'autre part, Notre étude consolide l'idée que l'impact du TGF- β est contexte-dépendant, notamment (i) de la présence d'autres signaux au moment de l'exposition des cellules au TGF- β (TCR, co-stimulation, autres cytokines,..); (ii) le stade d'activation et de différenciation des cellules, puisque notre étude montre que TGF- β induit la différenciation mémoire ou son maintien sur les LT naïfs (T_n) et central mémoire (T_{cm}), mais n'a aucun effet sur les LT effecteurs mémoire (T_{em}). Ceci pourrait être dû au fait que les T_n et T_{cm} ont un profil épigénétique (modifications d'histones, accessibilité de la chromatine) distinct des T_{em}, entraînant une sensibilité différente aux facteurs présents lors de leur activation. Et (iii) du moment de l'exposition, puisque nous pensons que TGF- β exerce son effet précocement lors

de l'intégration des premiers signaux d'activation par les LT, en instruisant un programme transcriptionnel qui permet aux LT, brièvement exposés au TGF- β *ex-vivo*, de conserver leurs effets bénéfiques à long terme *in-vivo*.

Enfin, nos résultats associent pour la première fois le TGF- β aux bases moléculaires de la différenciation mémoire des cellules T humaines et élargissent notre compréhension sur le rôle du TGF- β dans la biologie des lymphocytes T, mais soulèvent par la même occasion plusieurs questions. En effet, les mécanismes par lesquels le TGF- β favorise une différenciation mémoire des LT restent incertains. Nous pensons, néanmoins, que l'implication de la voie TGF- β /miR-23a/BLIMP1/ID3 semble être la plus plausible. Des études ultérieures seront nécessaires pour déterminer les bases moléculaires qui régulent la transcription des gènes associés à la mémoire en aval de la signalisation du TGF- β , nous permettrait de mieux maîtriser sa modulation en IA.

La mise en évidence de biomarqueurs prédictifs de la réponse des patients aux immunothérapies va permettre de choisir les thérapies de combinaison les plus adaptées pour chaque patient, afin d'en optimiser les effets. La vision ainsi renouvelée du rôle du TGF- β dans la biologie du LT comme étant capables de favoriser une différenciation mémoire *ex-vivo* et d'améliorer la migration et la rétention des LT dans la tumeur, représente une avancée importante et ouvre des perspectives de thérapies combinatoires potentiellement efficaces.

Bibliographie

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. PubMed PMID: 30207593.
2. cancer Ccdscsl. Statistiques canadiennes sur le cancer 2018. Toronto, ON: Société canadienne du cancer, 2018. Accessible à cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2018-FR 2018 [(consulté en juin 2018)].
3. Berenblum I, Shubik P. A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *Br J Cancer*. 1947 Dec;1(4):383-91. PubMed PMID: 18906316. Pubmed Central PMCID: 2007527.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. PubMed PMID: 10647931.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230.
6. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):715-27. PubMed PMID: 16977338.
7. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991-8. PubMed PMID: 12407406.
8. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1-27. PubMed PMID: 4921480.
9. Burnet M. Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis. *Br Med Bull*. 1964 May;20:154-8. PubMed PMID: 14168097.
10. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*. 1982 May-Aug;55(3-4):329-33. PubMed PMID: 6758376. Pubmed Central PMCID: 2596448.
11. Osborne BA, GR, Kindt TJ. *Kuby Immunology*. 6 ed 2007.
12. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 1974 Feb 8;183(4124):534-6. PubMed PMID: 4588620.
13. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107-11. PubMed PMID: 11323675.
14. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine*. 2000 Sep 4;192(5):755-60. PubMed PMID: 10974040. Pubmed Central PMCID: 2193269.
15. Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Jul 1;196(1):129-34. PubMed PMID: 12093877. Pubmed Central PMCID: 2194011.
16. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:16-25. PubMed PMID: 24531241. Pubmed Central PMCID: 4388310.
17. Lussier D, MaS, R. D. *Cancer Immunosurveillance: Immunoediting*. Reference Module in Biomedical Sciences. 2016.
18. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70. PubMed PMID: 21436444.

19. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60. PubMed PMID: 15032581.
20. Gollob JA, Sciambi CJ, Huang Z, Dressman HK. Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN-gamma. *Cancer Res.* 2005 Oct 1;65(19):8869-77. PubMed PMID: 16204058.
21. Wall L, Burke F, Barton C, Smyth J, Balkwill F. IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res.* 2003 Jul;9(7):2487-96. PubMed PMID: 12855622.
22. Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, et al. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):4095-100. PubMed PMID: 12874012.
23. Zhu Z, Cuss SM, Singh V, Gurusamy D, Shoe JL, Leighty R, et al. CD4+ T Cell Help Selectively Enhances High-Avidity Tumor Antigen-Specific CD8+ T Cells. *J Immunol.* 2015 Oct 1;195(7):3482-9. PubMed PMID: 26320256.
24. Accolla RS, Tosi G. Optimal MHC-II-restricted tumor antigen presentation to CD4+ T helper cells: the key issue for development of anti-tumor vaccines. *J Transl Med.* 2012 Jul 31;10:154. PubMed PMID: 22849661. Pubmed Central PMCID: 3478985.
25. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* 2007 Nov;7(11):834-46. PubMed PMID: 17957189. Pubmed Central PMCID: 2519109.
26. MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):567-8. PubMed PMID: 12571271.
27. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007 Dec 6;450(7171):903-7. PubMed PMID: 18026089.
28. Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature.* 2013 Feb 21;494(7437):361-5. PubMed PMID: 23376950.
29. Muller-Hermelink N, Braumuller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, et al. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell.* 2008 Jun;13(6):507-18. PubMed PMID: 18538734.
30. Teng MW, Vesely MD, Duret H, McLaughlin N, Towne JE, Schreiber RD, et al. Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res.* 2012 Aug 15;72(16):3987-96. PubMed PMID: 22869585. Pubmed Central PMCID: 4384890.
31. Wu X, Peng M, Huang B, Zhang H, Wang H, Huang B, et al. Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett.* 2013 Oct 28;340(1):124-33. PubMed PMID: 23920127.
32. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* 2000;74:181-273. PubMed PMID: 10605607.
33. Algarra I, Cabrera T, Garrido F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol.* 2000 Jan;61(1):65-73. PubMed PMID: 10658979.
34. Chang CC, Campoli M, Restifo NP, Wang X, Ferrone S. Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing machinery component down-regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy. *J Immunol.* 2005 Feb 1;174(3):1462-71. PubMed PMID: 15661905. Pubmed Central PMCID: 2245899.
35. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 1997 Feb;18(2):89-95. PubMed PMID: 9057360.

36. Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today*. 1999 Apr;5(4):178-86. PubMed PMID: 10203751.
37. Johnsen AK, Templeton DJ, Sy M, Harding CV. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol*. 1999 Oct 15;163(8):4224-31. PubMed PMID: 10510359.
38. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, et al. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *The Journal of experimental medicine*. 1993 Feb 1;177(2):265-72. PubMed PMID: 8426105. Pubmed Central PMCID: 1950463.
39. Rotem-Yehudar R, Groettrup M, Soza A, Kloetzel PM, Ehrlich R. LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class 1 MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *The Journal of experimental medicine*. 1996 Feb 1;183(2):499-514. PubMed PMID: 8627162. Pubmed Central PMCID: 2192445.
40. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. TAP off--tumors on. *Immunol Today*. 1997 Jun;18(6):292-9. PubMed PMID: 9190116.
41. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today*. 2000 Sep;21(9):455-64. PubMed PMID: 10953098.
42. Khong HT, Wang QJ, Rosenberg SA. Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J Immunother*. 2004 May-Jun;27(3):184-90. PubMed PMID: 15076135. Pubmed Central PMCID: 2275330.
43. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7556-61. PubMed PMID: 9636188. Pubmed Central PMCID: 22681.
44. Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiiriou I, Estcourt MJ, Hersey P, Tam ND, et al. Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem*. 1997 Nov 7;272(45):28779-85. PubMed PMID: 9353349.
45. Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res*. 2005 Nov 15;65(22):10139-44. PubMed PMID: 16287995.
46. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):190-5. PubMed PMID: 9217161.
47. Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood*. 1997 Dec 1;90(11):4266-70. PubMed PMID: 9373236.
48. Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, et al. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol*. 1999 Jun;154(6):1785-91. PubMed PMID: 10362803. Pubmed Central PMCID: 1866623.
49. Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH, Kubin MZ. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol*. 1998 Sep 15;161(6):2833-40. PubMed PMID: 9743343.
50. Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov;1(2):142-50. PubMed PMID: 11905805.
51. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988 Sep 29;335(6189):440-2. PubMed PMID: 3262202.
52. Medema JP, de Jong J, Peltenburg LT, Verdegaal EM, Gorter A, Bres SA, et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6

- constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11515-20. PubMed PMID: 11562487. Pubmed Central PMCID: 58761.
53. Li YL, Zhao H, Ren XB. Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biol Med*. 2016 Jun;13(2):206-14. PubMed PMID: 27458528. Pubmed Central PMCID: 4944543.
54. Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 1998 Feb 1;160(3):1224-32. PubMed PMID: 9570538.
55. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):1755-66. PubMed PMID: 10815894.
56. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 31;349(5):427-34. PubMed PMID: 12890841. Pubmed Central PMCID: 2275324.
57. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015 Oct 28;367(2):103-7. PubMed PMID: 26188281.
58. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine*. 1989 Dec 1;170(6):2081-95. PubMed PMID: 2531194. Pubmed Central PMCID: 2189521.
59. Smith LK, Boukhaled GM, Condotta SA, Mazouz S, Guthmiller JJ, Vijay R, et al. Interleukin-10 Directly Inhibits CD8(+) T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity*. 2018 Feb 20;48(2):299-312 e5. PubMed PMID: 29396160. Pubmed Central PMCID: 5935130.
60. Girolomoni G, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today*. 1997 Mar;18(3):102-4. PubMed PMID: 9078679.
61. Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, et al. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol*. 1999 Nov 1;163(9):5020-8. PubMed PMID: 10528207.
62. Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck RA, Pauli G. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol*. 1995 Jul;25(7):1943-50. PubMed PMID: 7621870.
63. Carbone E, Terrazzano G, Ruggiero G, Zanzi D, Ottaiano A, Manzo C, et al. Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol*. 1999 Dec;29(12):4022-9. PubMed PMID: 10602012.
64. Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, et al. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer*. 1997 May 16;71(4):630-7. PubMed PMID: 9178819.
65. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology*. 2001 Jun;103(2):131-6. PubMed PMID: 11412299. Pubmed Central PMCID: 1783236.
66. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res*. 1998 Mar 15;58(6):1208-16. PubMed PMID: 9515807.
67. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res*. 1992 Dec 15;52(24):6949-52. PubMed PMID: 1458485.

68. Lin EY, Gouon-Evans V, Nguyen AV, Pollard JW. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002 Apr;7(2):147-62. PubMed PMID: 12465600.
69. Lind MH, Rozell B, Wallin RP, van Hogerlinden M, Ljunggren HG, Toftgard R, et al. Tumor necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-kappaB inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):4972-7. PubMed PMID: 15044707. Pubmed Central PMCID: 387358.
70. Muller AJ, Prendergast GC. Marrying immunotherapy with chemotherapy: why say IDO? *Cancer Res*. 2005 Sep 15;65(18):8065-8. PubMed PMID: 16166276.
71. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol*. 2009 Oct;158(3):638-51. PubMed PMID: 19764983. Pubmed Central PMCID: 2765586.
72. Prendergast GC. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene*. 2008 Jun 26;27(28):3889-900. PubMed PMID: 18317452.
73. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol*. 2011 May;11(5):330-42. PubMed PMID: 21508983.
74. Nakashima M, Sonoda K, Watanabe T. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nature medicine*. 1999 Aug;5(8):938-42. PubMed PMID: 10426319.
75. Okada K, Nakashima M, Komuta K, Hashimoto S, Okudaira S, Baba N, et al. Expression of tumor-associated membrane antigen, RCAS1, in human colorectal carcinomas and possible role in apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol*. 2003 Jul;16(7):679-85. PubMed PMID: 12861064.
76. Birkle S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*. 2003 Mar-Apr;85(3-4):455-63. PubMed PMID: 12770784.
77. Jacobs JF, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJ, Adema GJ. Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol*. 2012 Jan;13(1):e32-42. PubMed PMID: 22225723.
78. Frydrychowicz M, Boruczowski M, Kolecka-Bednarczyk A, Dworacki G. The Dual Role of Treg in Cancer. *Scand J Immunol*. 2017 Dec;86(6):436-43. PubMed PMID: 28941312.
79. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87. PubMed PMID: 18510923.
80. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. PubMed PMID: 12490959. Pubmed Central PMCID: 2803035.
81. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44. PubMed PMID: 18650914.
82. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*. 2017 Jan;5(1):3-8. PubMed PMID: 28052991. Pubmed Central PMCID: PMC5426480.
83. Messmer MN, Netherby CS, Banik D, Abrams SI. Tumor-induced myeloid dysfunction and its implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Jan;64(1):1-13. PubMed PMID: 25432147. Pubmed Central PMCID: 4282948.
84. Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Jun;1319:47-65. PubMed PMID: 24965257.
85. Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol*. 2012 Dec 15;189(12):5602-11. PubMed PMID: 23152559.

86. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res.* 2008 Jul 1;68(13):5439-49. PubMed PMID: 18593947. Pubmed Central PMCID: 2887390.
87. Viola A, Bronte V. Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses. *Semin Cancer Biol.* 2007 Aug;17(4):309-16. PubMed PMID: 17651985.
88. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):641-54. PubMed PMID: 16056256.
89. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar 22;12(4):253-68. PubMed PMID: 22437938. Pubmed Central PMCID: 3587148.
90. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 3;95(3):1178-83. PubMed PMID: 9448305. Pubmed Central PMCID: 18712.
91. Vasaturo A, Di Blasio S, Peeters DG, de Koning CC, de Vries JM, Figdor CG, et al. Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go. *Front Immunol.* 2013 Dec 3;4:417. PubMed PMID: 24348481. Pubmed Central PMCID: 3847559.
92. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *The Journal of experimental medicine.* 1996 Jun 1;183(6):2533-40. PubMed PMID: 8676074. Pubmed Central PMCID: 2192613.
93. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *The Journal of experimental medicine.* 1996 Jun 1;183(6):2541-50. PubMed PMID: 8676075. Pubmed Central PMCID: 2192609.
94. 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. *J Immunol.* 2004 Jul 15;173(2):945-54. PubMed PMID: 15240681.
95. 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. *The Journal of experimental medicine.* 2012 Jun 4;209(6):1201-17. PubMed PMID: 22641383. Pubmed Central PMCID: 3371732.
96. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS letters.* 2004 Sep 10;574(1-3):37-41. PubMed PMID: 15358536.
97. 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 Mar 31;355(6332):1428-33. PubMed PMID: 28280247. Pubmed Central PMCID: 6286077.
98. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nature medicine.* 2010 Oct;16(10):1147-51. PubMed PMID: 20890291. Pubmed Central PMCID: 3326577.
99. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine.* 2002 Aug;8(8):793-800. PubMed PMID: 12091876.
100. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704. PubMed PMID: 18173375.

101. Klechevsky E, Banchereau J. Human dendritic cells subsets as targets and vectors for therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 May;1284:24-30. PubMed PMID: 23651190.
102. Suciú-Foca N, Feirt N, Zhang QY, Vlad G, Liu Z, Lin H, et al. Soluble Ig-like transcript 3 inhibits tumor allograft rejection in humanized SCID mice and T cell responses in cancer patients. *J Immunol.* 2007 Jun 1;178(11):7432-41. PubMed PMID: 17513794.
103. Anderson AC. Tim-3: an emerging target in the cancer immunotherapy landscape. *Cancer Immunol Res.* 2014 May;2(5):393-8. PubMed PMID: 24795351.
104. Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol.* 2013 Nov;34(11):556-63. PubMed PMID: 23954143. Pubmed Central PMCID: 3821798.
105. Wang L, Rubinstein R, Lines JL, Wasiuk A, Ahonen C, Guo Y, et al. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *The Journal of experimental medicine.* 2011 Mar 14;208(3):577-92. PubMed PMID: 21383057. Pubmed Central PMCID: 3058578.
106. Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* 2012 Feb 15;72(4):887-96. PubMed PMID: 22205715. Pubmed Central PMCID: 3288235.
107. Hobo W, Norde WJ, Schaap N, Fredrix H, Maas F, Schellens K, et al. B and T lymphocyte attenuator mediates inhibition of tumor-reactive CD8+ T cells in patients after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunol.* 2012 Jul 1;189(1):39-49. PubMed PMID: 22634623.
108. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun;8(6):467-77. PubMed PMID: 18500231.
109. Whiteside TL, Demaria S, Rodriguez-Ruiz ME, Zarour HM, Melero I. Emerging Opportunities and Challenges in Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2016 Apr 15;22(8):1845-55. PubMed PMID: 27084738. Pubmed Central PMCID: 4943317.
110. Zhang H, Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J Cancer.* 2018;9(10):1773-81. PubMed PMID: 29805703. Pubmed Central PMCID: 5968765.
111. Finn OJ. The dawn of vaccines for cancer prevention. *Nat Rev Immunol.* 2018 Mar;18(3):183-94. PubMed PMID: 29279613.
112. Harper DM, DeMars LR. Corrigendum to "HPV vaccines-A review of the first decade" [*Gynecol Oncol.* 146 (2017) 196-204]. *Gynecol Oncol.* 2017 Nov;147(2):489. PubMed PMID: 28844538.
113. Melief CJ, van Hall T, Arens R, Ossendorp F, van der Burg SH. Therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest.* 2015 Sep;125(9):3401-12. PubMed PMID: 26214521. Pubmed Central PMCID: 4588240.
114. Song Q, Zhang CD, Wu XH. Therapeutic cancer vaccines: From initial findings to prospects. *Immunol Lett.* 2018 Apr;196:11-21. PubMed PMID: 29407608.
115. Nguyen T, Urban J, Kalinski P. Therapeutic cancer vaccines and combination immunotherapies involving vaccination. *Immunotargets Ther.* 2014;3:135-50. PubMed PMID: 27471705. Pubmed Central PMCID: 4918241.
116. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010 Jul 29;363(5):411-22. PubMed PMID: 20818862.
117. Schwartzenuber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2011 Jun 2;364(22):2119-27. PubMed PMID: 21631324. Pubmed Central PMCID: 3517182.
118. Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, Janik JE, Muggia FM, Gockerman JP, et al. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular

- lymphoma. *J Clin Oncol*. 2011 Jul 10;29(20):2787-94. PubMed PMID: 21632504. Pubmed Central PMCID: 3139394.
119. Linette GP, Carreno BM. Neoantigen Vaccines Pass the Immunogenicity Test. *Trends Mol Med*. 2017 Oct;23(10):869-71. PubMed PMID: 28867556. Pubmed Central PMCID: 5624828.
120. Lu YC, Robbins PF. Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Semin Immunol*. 2016 Feb;28(1):22-7. PubMed PMID: 26653770. Pubmed Central PMCID: 4862880.
121. Laumont CM, Vincent K, Hesnard L, Audemard E, Bonneil E, Laverdure JP, et al. Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Sci Transl Med*. 2018 Dec 5;10(470). PubMed PMID: 30518613.
122. Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, Kaabinejadian S, Hundal J, Petti AA, et al. Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science*. 2015 May 15;348(6236):803-8. PubMed PMID: 25837513. Pubmed Central PMCID: 4549796.
123. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):577-81. PubMed PMID: 25428507. Pubmed Central PMCID: 4279952.
124. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*. 2017 Jul 13;547(7662):217-21. PubMed PMID: 28678778. Pubmed Central PMCID: 5577644.
125. Nizard M, Diniz MO, Roussel H, Tran T, Ferreira LC, Badoual C, et al. Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(8):2175-87. PubMed PMID: 25424921. Pubmed Central PMCID: 4896761.
126. Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016 Apr 15;22(8):1856-64. PubMed PMID: 27084739. Pubmed Central PMCID: 4872712.
127. Apetoh L, Smyth MJ, Drake CG, Abastado JP, Apte RN, Ayyoub M, et al. Consensus nomenclature for CD8(+) T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology*. 2015 Apr;4(4):e998538. PubMed PMID: 26137416. Pubmed Central PMCID: 4485711.
128. Turnis ME, Andrews LP, Vignali DA. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2015 Jul;45(7):1892-905. PubMed PMID: 26018646. Pubmed Central PMCID: 4549156.
129. Pasero C, Olive D. Interfering with coinhibitory molecules: BTLA/HVEM as new targets to enhance anti-tumor immunity. *Immunol Lett*. 2013 Mar;151(1-2):71-5. PubMed PMID: 23439006.
130. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol*. 2015 Apr;15(4):243-54. PubMed PMID: 25743219.
131. Ning YM, Suzman D, Maher VE, Zhang L, Tang S, Ricks T, et al. FDA Approval Summary: Atezolizumab for the Treatment of Patients with Progressive Advanced Urothelial Carcinoma after Platinum-Containing Chemotherapy. *Oncologist*. 2017 Jun;22(6):743-9. PubMed PMID: 28424325. Pubmed Central PMCID: 5469588.
132. Sul J, Blumenthal GM, Jiang X, He K, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Patients With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Whose Tumors Express Programmed Death-Ligand 1. *Oncologist*. 2016 May;21(5):643-50. PubMed PMID: 27026676. Pubmed Central PMCID: 4861368.
133. Syed YY. Durvalumab: First Global Approval. *Drugs*. 2017 Aug;77(12):1369-76. PubMed PMID: 28643244. Pubmed Central PMCID: 5636860.
134. Thallinger C, Fureder T, Preusser M, Heller G, Mullauer L, Holler C, et al. Review of cancer treatment with immune checkpoint inhibitors : Current concepts, expectations, limitations and pitfalls. *Wien Klin Wochenschr*. 2018 Feb;130(3-4):85-91. PubMed PMID: 29098404. Pubmed Central PMCID: 5816095.

135. Nouri Rouzbahani F, Shirkhoda M, Memari F, Dana H, Mahmoodi Chalbatani G, Mahmoodzadeh H, et al. Immunotherapy a New Hope for Cancer Treatment: A Review. *Pak J Biol Sci.* 2018;21(3):135-50. PubMed PMID: 30187723.
136. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland A, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017 Oct;18(10):1307-16. PubMed PMID: 28919011.
137. Dine J, Gordon R, Shames Y, Kasler MK, Barton-Burke M. Immune Checkpoint Inhibitors: An Innovation in Immunotherapy for the Treatment and Management of Patients with Cancer. *Asia Pac J Oncol Nurs.* 2017 Apr-Jun;4(2):127-35. PubMed PMID: 28503645. Pubmed Central PMCID: 5412150.
138. Melero I, Hirschhorn-Cymerman D, Morales-Kastresana A, Sanmamed MF, Wolchok JD. Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells. *Clin Cancer Res.* 2013 Mar 1;19(5):1044-53. PubMed PMID: 23460535. Pubmed Central PMCID: 4397897.
139. Ascierto PA, Simeone E, Sznol M, Fu YX, Melero I. Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin Oncol.* 2010 Oct;37(5):508-16. PubMed PMID: 21074066.
140. Moran AE, Kovacovics-Bankowski M, Weinberg AD. The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2013 Apr;25(2):230-7. PubMed PMID: 23414607. Pubmed Central PMCID: 3815601.
141. Schaer DA, Murphy JT, Wolchok JD. Modulation of GITR for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2012 Apr;24(2):217-24. PubMed PMID: 22245556. Pubmed Central PMCID: 3413251.
142. Bell J, McFadden G. Viruses for tumor therapy. *Cell Host Microbe.* 2014 Mar 12;15(3):260-5. PubMed PMID: 24629333. Pubmed Central PMCID: 3963258.
143. Kelly E, Russell SJ. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther.* 2007 Apr;15(4):651-9. PubMed PMID: 17299401.
144. Taqi AM, Abdurrahman MB, Yakubu AM, Fleming AF. Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet.* 1981 May 16;1(8229):1112. PubMed PMID: 6112483.
145. Howells A, Marelli G, Lemoine NR, Wang Y. Oncolytic Viruses-Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer. *Front Oncol.* 2017;7:195. PubMed PMID: 28944214. Pubmed Central PMCID: PMC5596080.
146. Marcato P, Shmulevitz M, Pan D, Stoltz D, Lee PW. Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Mol Ther.* 2007 Aug;15(8):1522-30. PubMed PMID: 17457318.
147. Meyers DE, Thakur S, Thirukkumaran CM, Morris DG. Oncolytic virotherapy as an immunotherapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2017 Dec 5;7(12):640. PubMed PMID: 29208938. Pubmed Central PMCID: 5802552.
148. Russell SJ, Peng KW. Oncolytic Virotherapy: A Contest between Apples and Oranges. *Mol Ther.* 2017 May 3;25(5):1107-16. PubMed PMID: 28392162. Pubmed Central PMCID: 5417845.
149. Tong AW, Senzer N, Cerullo V, Templeton NS, Hemminki A, Nemunaitis J. Oncolytic viruses for induction of anti-tumor immunity. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Jul;13(9):1750-60. PubMed PMID: 21740355.
150. Brown MC, Holl EK, Boczkowski D, Dobrikova E, Mosaheb M, Chandramohan V, et al. Cancer immunotherapy with recombinant poliovirus induces IFN-dominant activation of dendritic cells and tumor antigen-specific CTLs. *Sci Transl Med.* 2017 Sep 20;9(408). PubMed PMID: 28931654. Pubmed Central PMCID: 6034685.
151. Fountzilias C, Patel S, Mahalingam D. Review: Oncolytic virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget.* 2017 Nov 24;8(60):102617-39. PubMed PMID: 29254276. Pubmed Central PMCID: 5731986.

152. Gromeier M, Lachmann S, Rosenfeld MR, Gutin PH, Wimmer E. Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6803-8. PubMed PMID: 10841575. Pubmed Central PMCID: 18745.
153. Reddy PS, Burroughs KD, Hales LM, Ganesh S, Jones BH, Idamakanti N, et al. Seneca Valley virus, a systemically deliverable oncolytic picornavirus, and the treatment of neuroendocrine cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Nov 7;99(21):1623-33. PubMed PMID: 17971529. Pubmed Central PMCID: 5261858.
154. Thorne SH, Contag CH. Integrating the biological characteristics of oncolytic viruses and immune cells can optimize therapeutic benefits of cell-based delivery. *Gene Ther*. 2008 May;15(10):753-8. PubMed PMID: 18356814.
155. Toda M, Martuza RL, Kojima H, Rabkin SD. In situ cancer vaccination: an IL-12 defective vector/replication-competent herpes simplex virus combination induces local and systemic antitumor activity. *J Immunol*. 1998 May 1;160(9):4457-64. PubMed PMID: 9574551.
156. Toda M, Rabkin SD, Kojima H, Martuza RL. Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Hum Gene Ther*. 1999 Feb 10;10(3):385-93. PubMed PMID: 10048391.
157. Lee P, Gujar S. Potentiating prostate cancer immunotherapy with oncolytic viruses. *Nat Rev Urol*. 2018 Apr;15(4):235-50. PubMed PMID: 29434366.
158. Tanoue K, Rosewell Shaw A, Watanabe N, Porter C, Rana B, Gottschalk S, et al. Armed Oncolytic Adenovirus-Expressing PD-L1 Mini-Body Enhances Antitumor Effects of Chimeric Antigen Receptor T Cells in Solid Tumors. *Cancer Res*. 2017 Apr 15;77(8):2040-51. PubMed PMID: 28235763. Pubmed Central PMCID: 5392365.
159. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 1;33(25):2780-8. PubMed PMID: 26014293.
160. Puzanov I, Milhem MM, Minor D, Hamid O, Li A, Chen L, et al. Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma. *J Clin Oncol*. 2016 Aug 1;34(22):2619-26. PubMed PMID: 27298410.
161. Sun L, Funchain P, Song JM, Rayman P, Tannenbaum C, Ko J, et al. Talimogene Laherparepvec combined with anti-PD-1 based immunotherapy for unresectable stage III-IV melanoma: a case series. *J Immunother Cancer*. 2018 May 16;6(1):36. PubMed PMID: 29764498. Pubmed Central PMCID: 5954455.
162. Babiker HM, Riaz IB, Husnain M, Borad MJ. Oncolytic virotherapy including Rigvir and standard therapies in malignant melanoma. *Oncolytic Virother*. 2017;6:11-8. PubMed PMID: 28224120. Pubmed Central PMCID: 5308590.
163. Yang JC, Rosenberg SA. Current approaches to the adoptive immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol*. 1988;233:459-67. PubMed PMID: 3265581.
164. Wrzesinski C, Paulos CM, Kaiser A, Muranski P, Palmer DC, Gattinoni L, et al. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *J Immunother*. 2010 Jan;33(1):1-7. PubMed PMID: 19952961. Pubmed Central PMCID: 3247626.
165. Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L, et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2010 May 1;16(9):2646-55. PubMed PMID: 20406835.
166. Chacon JA, Wu RC, Sukhumalchandra P, Molldrem JJ, Sarnaik A, Pilon-Thomas S, et al. Co-stimulation through 4-1BB/CD137 improves the expansion and function of CD8(+) melanoma tumor-

- infiltrating lymphocytes for adoptive T-cell therapy. *PLoS One*. 2013;8(4):e60031. PubMed PMID: 23560068. Pubmed Central PMCID: 3613355.
167. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2346-57. PubMed PMID: 15800326. Pubmed Central PMCID: 1475951.
168. Goff SL, Smith FO, Klapper JA, Sherry R, Wunderlich JR, Steinberg SM, et al. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: analysis of tumors resected for TIL. *J Immunother*. 2010 Oct;33(8):840-7. PubMed PMID: 20842052. Pubmed Central PMCID: 6322671.
169. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):850-4. PubMed PMID: 12242449. Pubmed Central PMCID: 1764179.
170. Johnson LA, Heemskerk B, Powell DJ, Jr., Cohen CJ, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):6548-59. PubMed PMID: 17056587. Pubmed Central PMCID: 2174608.
171. Cohen CJ, Zheng Z, Bray R, Zhao Y, Sherman LA, Rosenberg SA, et al. Recognition of fresh human tumor by human peripheral blood lymphocytes transduced with a bicistronic retroviral vector encoding a murine anti-p53 TCR. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):5799-808. PubMed PMID: 16237072. Pubmed Central PMCID: 1473968.
172. Parkhurst MR, Joo J, Riley JP, Yu Z, Li Y, Robbins PF, et al. Characterization of genetically modified T-cell receptors that recognize the CEA:691-699 peptide in the context of HLA-A2.1 on human colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2009 Jan 1;15(1):169-80. PubMed PMID: 19118044. Pubmed Central PMCID: 3474199.
173. Zhao Y, Bennett AD, Zheng Z, Wang QJ, Robbins PF, Yu LY, et al. High-affinity TCRs generated by phage display provide CD4+ T cells with the ability to recognize and kill tumor cell lines. *J Immunol*. 2007 Nov 1;179(9):5845-54. PubMed PMID: 17947658. Pubmed Central PMCID: 2140228.
174. Clay TM, Custer MC, Sachs J, Hwu P, Rosenberg SA, Nishimura MI. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol*. 1999 Jul 1;163(1):507-13. PubMed PMID: 10384155.
175. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):126-9. PubMed PMID: 16946036. Pubmed Central PMCID: 2267026.
176. Cohen CJ, Li YF, El-Gamil M, Robbins PF, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res*. 2007 Apr 15;67(8):3898-903. PubMed PMID: 17440104. Pubmed Central PMCID: 2147081.
177. Robbins PF, Li YF, El-Gamil M, Zhao Y, Wargo JA, Zheng Z, et al. Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):6116-31. PubMed PMID: 18424733. Pubmed Central PMCID: 2424230.
178. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nature medicine*. 2015 Aug;21(8):914-21. PubMed PMID: 26193344. Pubmed Central PMCID: 4529359.
179. Sandri S, Bobisse S, Moxley K, Lamolinara A, De Sanctis F, Boschi F, et al. Feasibility of Telomerase-Specific Adoptive T-cell Therapy for B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Solid Malignancies. *Cancer Res*. 2016 May 1;76(9):2540-51. PubMed PMID: 27197263.

180. Tran E, Robbins PF, Lu YC, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, et al. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Dec 8;375(23):2255-62. PubMed PMID: 27959684. Pubmed Central PMCID: 5178827.
181. Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV, Rapoport AP, Levine BL, Emery L, et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):863-71. PubMed PMID: 23770775. Pubmed Central PMCID: 3743463.
182. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother*. 2013 Feb;36(2):133-51. PubMed PMID: 23377668. Pubmed Central PMCID: 3581823.
183. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*. 2013 Apr;3(4):388-98. PubMed PMID: 23550147. Pubmed Central PMCID: 3667586.
184. Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, Hwang WT, Plesa G, Hege KM, et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci Transl Med*. 2012 May 2;4(132):132ra53. PubMed PMID: 22553251. Pubmed Central PMCID: 4368443.
185. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Aug 25;365(8):725-33. PubMed PMID: 21830940. Pubmed Central PMCID: 3387277.
186. Riet T, Holzinger A, Dorrie J, Schaft N, Schuler G, Abken H. Nonviral RNA transfection to transiently modify T cells with chimeric antigen receptors for adoptive therapy. *Methods Mol Biol*. 2013;969:187-201. PubMed PMID: 23296935.
187. Singh H, Huls H, Kebriaei P, Cooper LJ. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19. *Immunol Rev*. 2014 Jan;257(1):181-90. PubMed PMID: 24329797. Pubmed Central PMCID: 4109051.
188. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28;346(6213):1258096. PubMed PMID: 25430774.
189. Choi BD, Suryadevara CM, Gedeon PC, Herndon JE, 2nd, Sanchez-Perez L, Bigner DD, et al. Intracerebral delivery of a third generation EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor is efficacious against human glioma. *J Clin Neurosci*. 2014 Jan;21(1):189-90. PubMed PMID: 24054399. Pubmed Central PMCID: 3867597.
190. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(8):1145-54. PubMed PMID: 25985798.
191. Chmielewski M, Hombach AA, Abken H. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunol Rev*. 2014 Jan;257(1):83-90. PubMed PMID: 24329791.
192. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 20;5(177):177ra38. PubMed PMID: 23515080. Pubmed Central PMCID: 3742551.
193. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*. 2011 Nov 3;118(18):4817-28. PubMed PMID: 21849486. Pubmed Central PMCID: 3208293.
194. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 Apr 18;368(16):1509-18. PubMed PMID: 23527958. Pubmed Central PMCID: 4058440.
195. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of

- anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*. 2012 Mar 22;119(12):2709-20. PubMed PMID: 22160384. Pubmed Central PMCID: 3327450.
196. Zhang BL, Qin DY, Mo ZM, Li Y, Wei W, Wang YS, et al. Hurdles of CAR-T cell-based cancer immunotherapy directed against solid tumors. *Sci China Life Sci*. 2016 Apr;59(4):340-8. PubMed PMID: 26965525.
197. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010 Apr;18(4):843-51. PubMed PMID: 20179677. Pubmed Central PMCID: 2862534.
198. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, Bondanza A, Traversari C, Salomoni M, et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):489-500. PubMed PMID: 19345145.
199. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011 Nov 3;365(18):1673-83. PubMed PMID: 22047558. Pubmed Central PMCID: 3236370.
200. Marin V, Cribioli E, Philip B, Tettamanti S, Pizzitola I, Biondi A, et al. Comparison of different suicide-gene strategies for the safety improvement of genetically manipulated T cells. *Hum Gene Ther Methods*. 2012 Dec;23(6):376-86. PubMed PMID: 23186165. Pubmed Central PMCID: 4015080.
201. Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol*. 2013 Jan;31(1):71-5. PubMed PMID: 23242161. Pubmed Central PMCID: 5505184.
202. Wilkie S, van Schalkwyk MC, Hobbs S, Davies DM, van der Stegen SJ, Pereira AC, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol*. 2012 Oct;32(5):1059-70. PubMed PMID: 22526592.
203. Grada Z, Hegde M, Byrd T, Shaffer DR, Ghazi A, Brawley VS, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013 Jul 9;2:e105. PubMed PMID: 23839099. Pubmed Central PMCID: 3731887.
204. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med*. 2013 Dec 11;5(215):215ra172. PubMed PMID: 24337479. Pubmed Central PMCID: 4238416.
205. June CH, Levine BL. T cell engineering as therapy for cancer and HIV: our synthetic future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Oct 19;370(1680):20140374. PubMed PMID: 26416683. Pubmed Central PMCID: 4634001.
206. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2012 Nov;12(11):749-61. PubMed PMID: 23080391. Pubmed Central PMCID: 4137483.
207. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*. 2012 Oct;12(10):671-84. PubMed PMID: 22996603. Pubmed Central PMCID: 6352980.
208. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev*. 2006 Jun;211:214-24. PubMed PMID: 16824130. Pubmed Central PMCID: 1501075.
209. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):355-60. PubMed PMID: 12640450.

210. De Rosa SC, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nature medicine*. 2001 Feb;7(2):245-8. PubMed PMID: 11175858.
211. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001 Oct 1;194(7):953-66. PubMed PMID: 11581317. Pubmed Central PMCID: 2193483.
212. Wu Z, Jia X, de la Cruz L, Su XC, Marzolf B, Troisch P, et al. Memory T cell RNA rearrangement programmed by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hnRNPLL. *Immunity*. 2008 Dec 19;29(6):863-75. PubMed PMID: 19100700. Pubmed Central PMCID: 3057111.
213. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999 Oct 14;401(6754):708-12. PubMed PMID: 10537110.
214. Henson SM, Franzese O, Macaulay R, Libri V, Azevedo RI, Kiani-Alikhan S, et al. KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6619-28. PubMed PMID: 19406987.
215. Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Touvrey C, Iancu EM, et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007 Apr 1;178(7):4112-9. PubMed PMID: 17371966.
216. Judge AD, Zhang X, Fujii H, Surh CD, Sprent J. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Oct 7;196(7):935-46. PubMed PMID: 12370255. Pubmed Central PMCID: 2194030.
217. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Jun 17;195(12):1523-32. PubMed PMID: 12070280. Pubmed Central PMCID: 2193564.
218. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1997 Nov 3;186(9):1407-18. PubMed PMID: 9348298. Pubmed Central PMCID: 2199103.
219. Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2000 Dec;1(6):469-74. PubMed PMID: 11101867.
220. Kambayashi T, Assarsson E, Lukacher AE, Ljunggren HG, Jensen PE. Memory CD8+ T cells provide an early source of IFN-gamma. *J Immunol*. 2003 Mar 1;170(5):2399-408. PubMed PMID: 12594263.
221. Zhang Q, Yang X, Pins M, Javonovic B, Kuzel T, Kim SJ, et al. Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8+ T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer. *Cancer Res*. 2005 Mar 1;65(5):1761-9. PubMed PMID: 15753372.
222. Gattinoni L, Zhong XS, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nature medicine*. 2009 Jul;15(7):808-13. PubMed PMID: 19525962. Pubmed Central PMCID: 2707501.
223. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature medicine*. 2011 Sep 18;17(10):1290-7. PubMed PMID: 21926977. Pubmed Central PMCID: 3192229.
224. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today*. 1994 Jul;15(7):321-31. PubMed PMID: 7522010.
225. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2016 Feb;16(2):79-89. PubMed PMID: 26688350.

226. Iijima N, Iwasaki A. Tissue instruction for migration and retention of TRM cells. *Trends Immunol.* 2015 Sep;36(9):556-64. PubMed PMID: 26282885. Pubmed Central PMCID: PMC4567393.
227. Shioh LR, Rosen DB, Brdickova N, Xu Y, An J, Lanier LL, et al. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature.* 2006 Mar 23;440(7083):540-4. PubMed PMID: 16525420.
228. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpreville V, et al. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol.* 2015 Apr 1;194(7):3475-86. PubMed PMID: 25725111.
229. Webb JR, Milne K, Watson P, Deleeuw RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Jan 15;20(2):434-44. PubMed PMID: 24190978.
230. Webb JR, Milne K, Nelson BH. PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2015 Aug;3(8):926-35. PubMed PMID: 25957117.
231. Amsen D, van Gisbergen K, Hombrink P, van Lier RAW. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat Immunol.* 2018 Jun;19(6):538-46. PubMed PMID: 29777219.
232. Ganesan AP, Clarke J, Wood O, Garrido-Martin EM, Chee SJ, Mellows T, et al. Tissue-resident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. *Nat Immunol.* 2017 Aug;18(8):940-50. PubMed PMID: 28628092. Pubmed Central PMCID: 6036910.
233. Zhou X, Yu S, Zhao DM, Harty JT, Badovinac VP, Xue HH. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity.* 2010 Aug 27;33(2):229-40. PubMed PMID: 20727791. Pubmed Central PMCID: 2928475.
234. Yang CY, Best JA, Knell J, Yang E, Sheridan AD, Jesionek AK, et al. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat Immunol.* 2011 Nov 6;12(12):1221-9. PubMed PMID: 22057289. Pubmed Central PMCID: 3872000.
235. Kim MV, Ouyang W, Liao W, Zhang MQ, Li MO. The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8+ T cell responses to infection. *Immunity.* 2013 Aug 22;39(2):286-97. PubMed PMID: 23932570. Pubmed Central PMCID: 3809840.
236. Bai A, Hu H, Yeung M, Chen J. Kruppel-like factor 2 controls T cell trafficking by activating L-selectin (CD62L) and sphingosine-1-phosphate receptor 1 transcription. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7632-9. PubMed PMID: 17548599.
237. Masson F, Minnich M, Olshansky M, Bilic I, Mount AM, Kallies A, et al. Id2-mediated inhibition of E2A represses memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol.* 2013 May 1;190(9):4585-94. PubMed PMID: 23536629. Pubmed Central PMCID: 3631715.
238. Omilusik KD, Nadsjombati MS, Shaw LA, Yu B, Milner JJ, Goldrath AW. Sustained Id2 regulation of E proteins is required for terminal differentiation of effector CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine.* 2018 Mar 5;215(3):773-83. PubMed PMID: 29440362. Pubmed Central PMCID: 5839762.
239. Li J, He Y, Hao J, Ni L, Dong C. High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8(+) T Cells. *Front Immunol.* 2018;9:2981. PubMed PMID: 30619337. Pubmed Central PMCID: 6305494.
240. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, et al. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science.* 2003 Nov 7;302(5647):1041-3. PubMed PMID: 14605368.
241. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription

- factor. *Immunity*. 2007 Aug;27(2):281-95. PubMed PMID: 17723218. Pubmed Central PMCID: 2034442.
242. Dominguez CX, Amezquita RA, Guan T, Marshall HD, Joshi NS, Kleinstein SH, et al. The transcription factors ZEB2 and T-bet cooperate to program cytotoxic T cell terminal differentiation in response to LCMV viral infection. *The Journal of experimental medicine*. 2015 Nov 16;212(12):2041-56. PubMed PMID: 26503446. Pubmed Central PMCID: 4647261.
243. Guan T, Dominguez CX, Amezquita RA, Laidlaw BJ, Cheng J, Henao-Mejia J, et al. ZEB1, ZEB2, and the miR-200 family form a counterregulatory network to regulate CD8(+) T cell fates. *The Journal of experimental medicine*. 2018 Apr 2;215(4):1153-68. PubMed PMID: 29449309. Pubmed Central PMCID: 5881466.
244. Behr FM, Chuwonpad A, Stark R, van Gisbergen K. Armed and Ready: Transcriptional Regulation of Tissue-Resident Memory CD8 T Cells. *Front Immunol*. 2018;9:1770. PubMed PMID: 30131803. Pubmed Central PMCID: 6090154.
245. Mackay LK, Kallies A. Transcriptional Regulation of Tissue-Resident Lymphocytes. *Trends Immunol*. 2017 Feb;38(2):94-103. PubMed PMID: 27939451.
246. Mackay LK, Minnich M, Kragten NA, Liao Y, Nota B, Seillet C, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science*. 2016 Apr 22;352(6284):459-63. PubMed PMID: 27102484.
247. Grueter B, Petter M, Egawa T, Laule-Kilian K, Aldrian CJ, Wuerch A, et al. Runx3 regulates integrin alpha E/CD103 and CD4 expression during development of CD4-/CD8+ T cells. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1694-705. PubMed PMID: 16034110.
248. Milner JJ, Toma C, Yu B, Zhang K, Omilusik K, Phan AT, et al. Runx3 programs CD8(+) T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature*. 2017 Dec 14;552(7684):253-7. PubMed PMID: 29211713. Pubmed Central PMCID: 5747964.
249. Wang D, Diao H, Getzler AJ, Rogal W, Frederick MA, Milner J, et al. The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation. *Immunity*. 2018 Apr 17;48(4):659-74 e6. PubMed PMID: 29669249.
250. Hombrink P, Helbig C, Backer RA, Piet B, Oja AE, Stark R, et al. Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8(+) lung-resident memory T cells. *Nat Immunol*. 2016 Dec;17(12):1467-78. PubMed PMID: 27776108.
251. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon ML, et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol*. 2013 Dec;14(12):1294-301. PubMed PMID: 24162776.
252. Boddupalli CS, Nair S, Gray SM, Nowyhed HN, Verma R, Gibson JA, et al. ABC transporters and NR4A1 identify a quiescent subset of tissue-resident memory T cells. *J Clin Invest*. 2016 Oct 3;126(10):3905-16. PubMed PMID: 27617863. Pubmed Central PMCID: 5096804.
253. Skon CN, Lee JY, Anderson KG, Masopust D, Hogquist KA, Jameson SC. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol*. 2013 Dec;14(12):1285-93. PubMed PMID: 24162775. Pubmed Central PMCID: 3844557.
254. Mackay LK, Wynne-Jones E, Freestone D, Pellicci DG, Mielke LA, Newman DM, et al. T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-beta and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity*. 2015 Dec 15;43(6):1101-11. PubMed PMID: 26682984.
255. Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol*. 2006 May;6(5):383-93. PubMed PMID: 16622476. Pubmed Central PMCID: 1473162.
256. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred

- CD8+ T cells. *J Clin Invest*. 2005 Jun;115(6):1616-26. PubMed PMID: 15931392. Pubmed Central PMCID: 1137001.
257. Hinrichs CS, Borman ZA, Cassard L, Gattinoni L, Spolski R, Yu Z, et al. Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells mediate superior antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 13;106(41):17469-74. PubMed PMID: 19805141. Pubmed Central PMCID: 2762661.
258. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, Huang J, et al. Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*. 2011 Jan 20;117(3):808-14. PubMed PMID: 20971955. Pubmed Central PMCID: 3035075.
259. Li Y, Innocenti S, Withers DR, Roberts NA, Gallagher AR, Grigorieva EF, et al. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell*. 2011 Oct 28;147(3):629-40. PubMed PMID: 21999944.
260. Sallusto F, Lanzavecchia A. Memory in disguise. *Nature medicine*. 2011 Oct 11;17(10):1182-3. PubMed PMID: 21988989.
261. Klebanoff CA, Finkelstein SE, Surman DR, Lichtman MK, Gattinoni L, Theoret MR, et al. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):1969-74. PubMed PMID: 14762166. Pubmed Central PMCID: 357036.
262. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 5;102(27):9571-6. PubMed PMID: 15980149. Pubmed Central PMCID: 1172264.
263. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):294-305. PubMed PMID: 18060041. Pubmed Central PMCID: 2104476.
264. Wang X, Berger C, Wong CW, Forman SJ, Riddell SR, Jensen MC. Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice. *Blood*. 2011 Feb 10;117(6):1888-98. PubMed PMID: 21123821. Pubmed Central PMCID: 3056638.
265. Butler MO, Friedlander P, Milstein MI, Mooney MM, Metzler G, Murray AP, et al. Establishment of antitumor memory in humans using in vitro-educated CD8+ T cells. *Sci Transl Med*. 2011 Apr 27;3(80):80ra34. PubMed PMID: 21525398. Pubmed Central PMCID: 3861895.
266. Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, Harms GM, Shen H, Wang LS, et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*. 2009 Jul 2;460(7251):103-7. PubMed PMID: 19494812. Pubmed Central PMCID: 2803086.
267. van der Windt GJ, Everts B, Chang CH, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity*. 2012 Jan 27;36(1):68-78. PubMed PMID: 22206904. Pubmed Central PMCID: 3269311.
268. Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, Forcato M, Oliveira G, Provasi E, et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood*. 2013 Jan 24;121(4):573-84. PubMed PMID: 23160470.
269. Albrecht J, Frey M, Teschner D, Carbol A, Theobald M, Herr W, et al. IL-21-treated naive CD45RA+ CD8+ T cells represent a reliable source for producing leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes with high proliferative potential and early differentiation phenotype. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Feb;60(2):235-48. PubMed PMID: 21046101.

270. Hinrichs CS, Spolski R, Paulos CM, Gattinoni L, Kerstann KW, Palmer DC, et al. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood*. 2008 Jun 1;111(11):5326-33. PubMed PMID: 18276844. Pubmed Central PMCID: 2396726.
271. Li Y, Bleakley M, Yee C. IL-21 influences the frequency, phenotype, and affinity of the antigen-specific CD8 T cell response. *J Immunol*. 2005 Aug 15;175(4):2261-9. PubMed PMID: 16081794.
272. Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *The Journal of experimental medicine*. 2005 Jan 3;201(1):139-48. PubMed PMID: 15630141. Pubmed Central PMCID: 2212766.
273. Crompton JG, Sukumar M, Restifo NP. Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy. *Immunol Rev*. 2014 Jan;257(1):264-76. PubMed PMID: 24329803. Pubmed Central PMCID: 3915736.
274. Rao RR, Li Q, Odunsi K, Shrikant PA. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity*. 2010 Jan 29;32(1):67-78. PubMed PMID: 20060330. Pubmed Central PMCID: 5836496.
275. Cohen P, Goedert M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Jun;3(6):479-87. PubMed PMID: 15173837.
276. Macintyre AN, Finlay D, Preston G, Sinclair LV, Waugh CM, Tamas P, et al. Protein kinase B controls transcriptional programs that direct cytotoxic T cell fate but is dispensable for T cell metabolism. *Immunity*. 2011 Feb 25;34(2):224-36. PubMed PMID: 21295499. Pubmed Central PMCID: 3052433.
277. Crompton JG, Sukumar M, Roychoudhuri R, Clever D, Gros A, Eil RL, et al. Akt inhibition enhances expansion of potent tumor-specific lymphocytes with memory cell characteristics. *Cancer Res*. 2015 Jan 15;75(2):296-305. PubMed PMID: 25432172. Pubmed Central PMCID: 4384335.
278. Klebanoff CA, Crompton JG, Leonardi AJ, Yamamoto TN, Chandran SS, Eil RL, et al. Inhibition of AKT signaling uncouples T cell differentiation from expansion for receptor-engineered adoptive immunotherapy. *JCI Insight*. 2017 Dec 7;2(23). PubMed PMID: 29212954. Pubmed Central PMCID: 5752304.
279. Mousset CM, Hobo W, Ji Y, Fredrix H, De Giorgi V, Allison RD, et al. Ex vivo AKT-inhibition facilitates generation of polyfunctional stem cell memory-like CD8(+) T cells for adoptive immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2018;7(10):e1488565. PubMed PMID: 30288356. Pubmed Central PMCID: 6169586.
280. Urak R, Walter M, Lim L, Wong CW, Budde LE, Thomas S, et al. Ex vivo Akt inhibition promotes the generation of potent CD19CAR T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2017;5:26. PubMed PMID: 28331616. Pubmed Central PMCID: 5359873.
281. van der Waart AB, van de Weem NM, Maas F, Kramer CS, Kester MG, Falkenburg JH, et al. Inhibition of Akt signaling promotes the generation of superior tumor-reactive T cells for adoptive immunotherapy. *Blood*. 2014 Nov 27;124(23):3490-500. PubMed PMID: 25336630. Pubmed Central PMCID: 4246043.
282. Petersen CT, Hassan M, Morris AB, Jeffery J, Lee K, Jagirdar N, et al. Improving T-cell expansion and function for adoptive T-cell therapy using ex vivo treatment with PI3Kdelta inhibitors and VIP antagonists. *Blood Adv*. 2018 Feb 13;2(3):210-23. PubMed PMID: 29386194. Pubmed Central PMCID: 5812323.
283. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009 Aug 20;114(8):1537-44. PubMed PMID: 19423728. Pubmed Central PMCID: 2927090.

284. Baitsch L, Baumgaertner P, Devevre E, Raghav SK, Legat A, Barba L, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2350-60. PubMed PMID: 21555851. Pubmed Central PMCID: 3104769.
285. Zippelius A, Batard P, Rubio-Godoy V, Bioley G, Lienard D, Lejeune F, et al. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res*. 2004 Apr 15;64(8):2865-73. PubMed PMID: 15087405.
286. Rohaan MW, van den Berg JH, Kvistborg P, Haanen J. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. *J Immunother Cancer*. 2018 Oct 3;6(1):102. PubMed PMID: 30285902. Pubmed Central PMCID: 6171186.
287. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2011 Apr 8;8(4):376-88. PubMed PMID: 21474102. Pubmed Central PMCID: 3090650.
288. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72. PubMed PMID: 18035408.
289. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. PubMed PMID: 16904174.
290. Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, et al. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet*. 2009 Sep;41(9):968-76. PubMed PMID: 19668214. Pubmed Central PMCID: 3987895.
291. Loh YH, Hartung O, Li H, Guo C, Sahalie JM, Manos PD, et al. Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell*. 2010 Jul 2;7(1):15-9. PubMed PMID: 20621044. Pubmed Central PMCID: 2913590.
292. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Jul 2;7(1):11-4. PubMed PMID: 20621043.
293. Clark RA, Yamanaka K, Bai M, Dowgiert R, Kupper TS. Human skin cells support thymus-independent T cell development. *J Clin Invest*. 2005 Nov;115(11):3239-49. PubMed PMID: 16224538. Pubmed Central PMCID: 1253623.
294. Lei F, Haque R, Weiler L, Vrana KE, Song J. T lineage differentiation from induced pluripotent stem cells. *Cell Immunol*. 2009;260(1):1-5. PubMed PMID: 19811778.
295. Schmitt TM, de Pooter RF, Gronski MA, Cho SK, Ohashi PS, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nat Immunol*. 2004 Apr;5(4):410-7. PubMed PMID: 15034575.
296. Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity*. 2002 Dec;17(6):749-56. PubMed PMID: 12479821.
297. Zhao Y, Parkhurst MR, Zheng Z, Cohen CJ, Riley JP, Gattinoni L, et al. Extrathymic generation of tumor-specific T cells from genetically engineered human hematopoietic stem cells via Notch signaling. *Cancer Res*. 2007 Mar 15;67(6):2425-9. PubMed PMID: 17363559. Pubmed Central PMCID: 2100408.
298. Themeli M, Kloss CC, Ciriello G, Fedorov VD, Perna F, Gonen M, et al. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat Biotechnol*. 2013 Oct;31(10):928-33. PubMed PMID: 23934177. Pubmed Central PMCID: 5722218.
299. Chen Y, Zander R, Khatun A, Schauder DM, Cui W. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation. *Front Immunol*. 2018;9:2826. PubMed PMID: 30581433. Pubmed Central PMCID: PMC6292868.

300. Crompton JG, Narayanan M, Cuddapah S, Roychoudhuri R, Ji Y, Yang W, et al. Lineage relationship of CD8(+) T cell subsets is revealed by progressive changes in the epigenetic landscape. *Cell Mol Immunol*. 2016 Jul;13(4):502-13. PubMed PMID: 25914936. Pubmed Central PMCID: 4947817.
301. Gray SM, Amezcua RA, Guan T, Kleinstein SH, Kaech SM. Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Chromatin Repression Guides Effector CD8(+) T Cell Terminal Differentiation and Loss of Multipotency. *Immunity*. 2017 Apr 18;46(4):596-608. PubMed PMID: 28410989. Pubmed Central PMCID: 5457165.
302. Kakaradov B, Arsenio J, Widjaja CE, He Z, Aigner S, Metz PJ, et al. Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8(+) T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol*. 2017 Apr;18(4):422-32. PubMed PMID: 28218746. Pubmed Central PMCID: 5360497.
303. Ladle BH, Li KP, Phillips MJ, Pucsek AB, Haile A, Powell JD, et al. De novo DNA methylation by DNA methyltransferase 3a controls early effector CD8+ T-cell fate decisions following activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Sep 20;113(38):10631-6. PubMed PMID: 27582468. Pubmed Central PMCID: 5035851.
304. Pace L, Goudot C, Zueva E, Gueguen P, Burgdorf N, Waterfall JJ, et al. The epigenetic control of stemness in CD8(+) T cell fate commitment. *Science*. 2018 Jan 12;359(6372):177-86. PubMed PMID: 29326266.
305. Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, et al. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*. 2007 Oct 10;2(10):e1020. PubMed PMID: 17925868. Pubmed Central PMCID: 2000354.
306. Zhang Z, Zhang C, Li F, Zhang B, Zhang Y. Regulation of Memory CD8+ T Cell Differentiation by MicroRNAs. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(6):2187-98. PubMed PMID: 30011396.
307. Zhang T, Zhang Z, Li F, Ping Y, Qin G, Zhang C, et al. miR-143 Regulates Memory T Cell Differentiation by Reprogramming T Cell Metabolism. *J Immunol*. 2018 Oct 1;201(7):2165-75. PubMed PMID: 30150287.
308. Tsai CY, Allie SR, Zhang W, Usherwood EJ. MicroRNA miR-155 affects antiviral effector and effector Memory CD8 T cell differentiation. *J Virol*. 2013 Feb;87(4):2348-51. PubMed PMID: 23221547. Pubmed Central PMCID: 3571487.
309. Li Y, Duo Y, Bi J, Zeng X, Mei L, Bao S, et al. Targeted delivery of anti-miR-155 by functionalized mesoporous silica nanoparticles for colorectal cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:1241-56. PubMed PMID: 29535520. Pubmed Central PMCID: PMC5841950.
310. Li Q, Johnston N, Zheng X, Wang H, Zhang X, Gao D, et al. miR-28 modulates exhaustive differentiation of T cells through silencing programmed cell death-1 and regulating cytokine secretion. *Oncotarget*. 2016 Aug 16;7(33):53735-50. PubMed PMID: 27447564. Pubmed Central PMCID: 5288217.
311. Khan AA, Penny LA, Yuzefpolskiy Y, Sarkar S, Kalia V. MicroRNA-17~92 regulates effector and memory CD8 T-cell fates by modulating proliferation in response to infections. *Blood*. 2013 May 30;121(22):4473-83. PubMed PMID: 23596046.
312. Wu T, Wieland A, Araki K, Davis CW, Ye L, Hale JS, et al. Temporal expression of microRNA cluster miR-17-92 regulates effector and memory CD8+ T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 19;109(25):9965-70. PubMed PMID: 22665768. Pubmed Central PMCID: 3382487.
313. Lin R, Chen L, Chen G, Hu C, Jiang S, Sevilla J, et al. Targeting miR-23a in CD8+ cytotoxic T lymphocytes prevents tumor-dependent immunosuppression. *J Clin Invest*. 2014 Dec;124(12):5352-67. PubMed PMID: 25347474. Pubmed Central PMCID: 4348954.

314. Lin R, Sampson JH, Li QJ, Zhu B. miR-23a blockade enhances adoptive T cell transfer therapy by preserving immune-competence in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. 2015 Mar;4(3):e990803. PubMed PMID: 25949909. Pubmed Central PMCID: 4404905.
315. Casey KA, Fraser KA, Schenkel JM, Moran A, Abt MC, Beura LK, et al. Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J Immunol*. 2012 May 15;188(10):4866-75. PubMed PMID: 22504644. Pubmed Central PMCID: 3345065.
316. El-Asady R, Yuan R, Liu K, Wang D, Gress RE, Lucas PJ, et al. TGF- β -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *The Journal of experimental medicine*. 2005 May 16;201(10):1647-57. PubMed PMID: 15897278. Pubmed Central PMCID: 2212926.
317. Masopust D, Schenkel JM. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol*. 2013 May;13(5):309-20. PubMed PMID: 23598650.
318. Nolz JC, Starbeck-Miller GR, Harty JT. Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions. *Immunotherapy*. 2011 Oct;3(10):1223-33. PubMed PMID: 21995573. Pubmed Central PMCID: 3214994.
319. Slaney CY, Kershaw MH, Darcy PK. Trafficking of T cells into tumors. *Cancer Res*. 2014 Dec 15;74(24):7168-74. PubMed PMID: 25477332.
320. Pockaj BA, Sherry RM, Wei JP, Yannelli JR, Carter CS, Leitman SF, et al. Localization of 111indium-labeled tumor infiltrating lymphocytes to tumor in patients receiving adoptive immunotherapy. Augmentation with cyclophosphamide and correlation with response. *Cancer*. 1994 Mar 15;73(6):1731-7. PubMed PMID: 8156501.
321. Fisher B, Packard BS, Read EJ, Carrasquillo JA, Carter CS, Topalian SL, et al. Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1989 Feb;7(2):250-61. PubMed PMID: 2644399.
322. Spranger S, Dai D, Horton B, Gajewski TF. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell*. 2017 May 8;31(5):711-23 e4. PubMed PMID: 28486109. Pubmed Central PMCID: 5650691.
323. Kershaw MH, Wang G, Westwood JA, Pachynski RK, Tiffany HL, Marincola FM, et al. Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2. *Hum Gene Ther*. 2002 Nov 1;13(16):1971-80. PubMed PMID: 12427307.
324. Brown CE, Vishwanath RP, Aguilar B, Starr R, Najbauer J, Aboody KS, et al. Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. *J Immunol*. 2007 Sep 1;179(5):3332-41. PubMed PMID: 17709550.
325. Di Stasi A, De Angelis B, Rooney CM, Zhang L, Mahendravada A, Foster AE, et al. T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood*. 2009 Jun 18;113(25):6392-402. PubMed PMID: 19377047. Pubmed Central PMCID: 2710932.
326. Rapp M, Grassmann S, Chaloupka M, Layritz P, Kruger S, Ormanns S, et al. C-C chemokine receptor type-4 transduction of T cells enhances interaction with dendritic cells, tumor infiltration and therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer. *Oncoimmunology*. 2016 Mar;5(3):e1105428. PubMed PMID: 27195186. Pubmed Central PMCID: 4859768.
327. Moon EK, Carpenito C, Sun J, Wang LC, Kapoor V, Predina J, et al. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 15;17(14):4719-30. PubMed PMID: 21610146. Pubmed Central PMCID: 3612507.

328. Spear P, Barber A, Sentman CL. Collaboration of chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells and host T cells for optimal elimination of established ovarian tumors. *Oncoimmunology*. 2013 Apr 1;2(4):e23564. PubMed PMID: 23734311. Pubmed Central PMCID: 3654581.
329. Peng W, Liu C, Xu C, Lou Y, Chen J, Yang Y, et al. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN-gamma inducible chemokines. *Cancer Res*. 2012 Oct 15;72(20):5209-18. PubMed PMID: 22915761. Pubmed Central PMCID: 3476734.
330. Hong M, Puaux AL, Huang C, Loumagne L, Tow C, Mackay C, et al. Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control. *Cancer Res*. 2011 Nov 15;71(22):6997-7009. PubMed PMID: 21948969.
331. Azzi S, Gavard J. [Blood vessels in cancer: can't stop whispering]. *Med Sci (Paris)*. 2014 Apr;30(4):408-14. PubMed PMID: 24801036. *Vaisseaux sanguins et tumeurs ou l'art du dialogue*.
332. Bellone M, Calcinotto A, Corti A. Won't you come on in? How to favor lymphocyte infiltration in tumors. *Oncoimmunology*. 2012 Sep 1;1(6):986-8. PubMed PMID: 23162781. Pubmed Central PMCID: 3489769.
333. Corti A, Pastorino F, Curnis F, Arap W, Ponzoni M, Pasqualini R. Targeted drug delivery and penetration into solid tumors. *Med Res Rev*. 2012 Sep;32(5):1078-91. PubMed PMID: 21287572.
334. Bellone M, Mondino A, Corti A. Vascular targeting, chemotherapy and active immunotherapy: teaming up to attack cancer. *Trends Immunol*. 2008 May;29(5):235-41. PubMed PMID: 18375183.
335. Dirx AE, oude Egbrink MG, Castermans K, van der Schaft DW, Thijssen VL, Dings RP, et al. Anti-angiogenesis therapy can overcome endothelial cell anergy and promote leukocyte-endothelium interactions and infiltration in tumors. *FASEB J*. 2006 Apr;20(6):621-30. PubMed PMID: 16581970.
336. Manning EA, Ullman JG, Leatherman JM, Asquith JM, Hansen TR, Armstrong TD, et al. A vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor enhances antitumor immunity through an immune-based mechanism. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 1;13(13):3951-9. PubMed PMID: 17606729.
337. Shrimali RK, Yu Z, Theoret MR, Chinnasamy D, Restifo NP, Rosenberg SA. Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res*. 2010 Aug 1;70(15):6171-80. PubMed PMID: 20631075. Pubmed Central PMCID: 2912959.
338. Chinnasamy D, Yu Z, Theoret MR, Zhao Y, Shrimali RK, Morgan RA, et al. Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice. *J Clin Invest*. 2010 Nov;120(11):3953-68. PubMed PMID: 20978347. Pubmed Central PMCID: PMC2964987.
339. Chen W, Ten Dijke P. Immunoregulation by members of the TGFbeta superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2016 Nov 25;16(12):723-40. PubMed PMID: 27885276.
340. Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Oct;13(10):616-30. PubMed PMID: 22992590. Pubmed Central PMCID: 4027049.
341. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther*. 2003 May;98(2):257-65. PubMed PMID: 12725873.
342. Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem*. 1995 May 5;270(18):10618-24. PubMed PMID: 7737999.
343. Annes JP, Chen Y, Munger JS, Rifkin DB. Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *J Cell Biol*. 2004 Jun 7;165(5):723-34. PubMed PMID: 15184403. Pubmed Central PMCID: 2172370.
344. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 2003 Jan 15;116(Pt 2):217-24. PubMed PMID: 12482908.

345. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*. 1998 Jun 26;93(7):1159-70. PubMed PMID: 9657149.
346. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 1999 Feb 5;96(3):319-28. PubMed PMID: 10025398.
347. Yehualaeshet T, O'Connor R, Green-Johnson J, Mai S, Silverstein R, Murphy-Ullrich JE, et al. Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am J Pathol*. 1999 Sep;155(3):841-51. PubMed PMID: 10487979. Pubmed Central PMCID: 1866879.
348. Worthington JJ, Fenton TM, Czajkowska BI, Klementowicz JE, Travis MA. Regulation of TGFbeta in the immune system: an emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology*. 2012 Dec;217(12):1259-65. PubMed PMID: 22902140. Pubmed Central PMCID: 3690473.
349. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:659-93. PubMed PMID: 16212511.
350. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005 Dec 1;19(23):2783-810. PubMed PMID: 16322555.
351. Liu T, Feng XH. Regulation of TGF-beta signalling by protein phosphatases. *Biochem J*. 2010 Sep 1;430(2):191-8. PubMed PMID: 20704570. Pubmed Central PMCID: 3154754.
352. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5262-70. PubMed PMID: 17875754.
353. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009 Apr;41(4):263-72. PubMed PMID: 19352540.
354. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limon P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol*. 2010 Aug;10(8):554-67. PubMed PMID: 20616810. Pubmed Central PMCID: 3885992.
355. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the Immune Response by TGF-beta: From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Jun 1;9(6). PubMed PMID: 28108486.
356. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal of experimental medicine*. 1986 May 1;163(5):1037-50. PubMed PMID: 2871125. Pubmed Central PMCID: 2188095.
357. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jan 15;90(2):770-4. PubMed PMID: 8421714. Pubmed Central PMCID: 45747.
358. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992 Oct 22;359(6397):693-9. PubMed PMID: 1436033. Pubmed Central PMCID: 3889166.
359. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146. PubMed PMID: 16551245.
360. Yaswen L, Kulkarni AB, Fredrickson T, Mittelman B, Schiffman R, Payne S, et al. Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood*. 1996 Feb 15;87(4):1439-45. PubMed PMID: 8608234.

361. Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol.* 1999 Apr;19(4):2495-504. PubMed PMID: 10082515. Pubmed Central PMCID: 84042.
362. Cazac BB, Roes J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity.* 2000 Oct;13(4):443-51. PubMed PMID: 11070163.
363. Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol.* 2005 Jun;6(6):600-7. PubMed PMID: 15852008.
364. Lucas PJ, Kim SJ, Melby SJ, Gress RE. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor. *The Journal of experimental medicine.* 2000 Apr 3;191(7):1187-96. PubMed PMID: 10748236. Pubmed Central PMCID: 2193176.
365. Nakao A, Miike S, Hatano M, Okumura K, Tokuhisa T, Ra C, et al. Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. *The Journal of experimental medicine.* 2000 Jul 17;192(2):151-8. PubMed PMID: 10899902. Pubmed Central PMCID: 2193250.
366. Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* 2000 Feb;12(2):171-81. PubMed PMID: 10714683.
367. Diebold RJ, Eis MJ, Yin M, Ormsby I, Boivin GP, Darrow BJ, et al. Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19;92(26):12215-9. PubMed PMID: 8618872. Pubmed Central PMCID: 40327.
368. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64. PubMed PMID: 7636184.
369. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):642-53. PubMed PMID: 20471291. Pubmed Central PMCID: 2880228.
370. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):632-40. PubMed PMID: 18438410.
371. Stritesky GL, Jameson SC, Hogquist KA. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:95-114. PubMed PMID: 22149933. Pubmed Central PMCID: 3518413.
372. Robinson RT, Gorham JD. TGF-beta 1 regulates antigen-specific CD4+ T cell responses in the periphery. *J Immunol.* 2007 Jul 1;179(1):71-9. PubMed PMID: 17579023.
373. Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E. Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol Cell Biol.* 1993 Feb;13(2):1155-62. PubMed PMID: 8423782. Pubmed Central PMCID: 359000.
374. McKarns SC, Schwartz RH, Kaminski NE. Smad3 is essential for TGF-beta 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J Immunol.* 2004 Apr 1;172(7):4275-84. PubMed PMID: 15034041.
375. Delisle JS, Giroux M, Boucher G, Landry JR, Hardy MP, Lemieux S, et al. The TGF-beta-Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells. *Genes Immun.* 2013 Mar;14(2):115-26. PubMed PMID: 23328844.

376. Ruegeimer JJ, Ho SN, Augustine JA, Schlager JW, Bell MP, McKean DJ, et al. Regulatory effects of transforming growth factor-beta on IL-2- and IL-4-dependent T cell-cycle progression. *J Immunol.* 1990 Mar 1;144(5):1767-76. PubMed PMID: 2407783.
377. Wolfrain LA, Walz TM, James Z, Fernandez T, Letterio JJ. p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF-beta-mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3093-102. PubMed PMID: 15322169.
378. Boussiotis VA, Chen ZM, Zeller JC, Murphy WJ, Berezovskaya A, Narula S, et al. Altered T-cell receptor + CD28-mediated signaling and blocked cell cycle progression in interleukin 10 and transforming growth factor-beta-treated alloreactive T cells that do not induce graft-versus-host disease. *Blood.* 2001 Jan 15;97(2):565-71. PubMed PMID: 11154238.
379. Chen CH, Seguin-Devaux C, Burke NA, Oriss TB, Watkins SC, Clipstone N, et al. Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *The Journal of experimental medicine.* 2003 Jun 16;197(12):1689-99. PubMed PMID: 12810687. Pubmed Central PMCID: 2193945.
380. Choudhry MA, Sir O, Sayeed MM. TGF-beta abrogates TCR-mediated signaling by upregulating tyrosine phosphatases in T cells. *Shock.* 2001 Mar;15(3):193-9. PubMed PMID: 11236902.
381. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell.* 2005 Nov;8(5):369-80. PubMed PMID: 16286245.
382. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *The Journal of experimental medicine.* 2002 Jun 3;195(11):1499-505. PubMed PMID: 12045248. Pubmed Central PMCID: 2193549.
383. Yoon JH, Jung SM, Park SH, Kato M, Yamashita T, Lee IK, et al. Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. *EMBO Mol Med.* 2013 Nov;5(11):1720-39. PubMed PMID: 24127404. Pubmed Central PMCID: 3840488.
384. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89. PubMed PMID: 20192806. Pubmed Central PMCID: 3502616.
385. Lewis GM, Wehrens EJ, Labarta-Bajo L, Streeck H, Zuniga EI. TGF-beta receptor maintains CD4 T helper cell identity during chronic viral infections. *J Clin Invest.* 2016 Oct 3;126(10):3799-813. PubMed PMID: 27599295. Pubmed Central PMCID: 5096797.
386. Lin JT, Martin SL, Xia L, Gorham JD. TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. *J Immunol.* 2005 May 15;174(10):5950-8. PubMed PMID: 15879087.
387. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol.* 2000 Nov 1;165(9):4773-7. PubMed PMID: 11045997.
388. Jabeen R, Goswami R, Awe O, Kulkarni A, Nguyen ET, Attenasio A, et al. Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J Clin Invest.* 2013 Nov;123(11):4641-53. PubMed PMID: 24216482. Pubmed Central PMCID: 3809790.
389. Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, et al. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol.* 1994 Nov 1;153(9):3989-96. PubMed PMID: 7930607.
390. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 May;15(5):295-307. PubMed PMID: 25848755. Pubmed Central PMCID: PMC4445728.
391. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 2006 Sep 22;126(6):1121-33. PubMed PMID: 16990136.

392. Das J, Ren G, Zhang L, Roberts AI, Zhao X, Bothwell AL, et al. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*. 2009 Oct 26;206(11):2407-16. PubMed PMID: 19808254. Pubmed Central PMCID: 2768861.
393. Salehi S, Bankoti R, Benevides L, Willen J, Couse M, Silva JS, et al. B lymphocyte-induced maturation protein-1 contributes to intestinal mucosa homeostasis by limiting the number of IL-17-producing CD4+ T cells. *J Immunol*. 2012 Dec 15;189(12):5682-93. PubMed PMID: 23162130. Pubmed Central PMCID: 3529138.
394. Zhu J, Davidson TS, Wei G, Jankovic D, Cui K, Schones DE, et al. Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-beta is important for differentiation of Th17 and CD103+ inducible regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2009 Feb 16;206(2):329-41. PubMed PMID: 19188499. Pubmed Central PMCID: 2646571.
395. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature*. 2008 May 8;453(7192):236-40. PubMed PMID: 18368049. Pubmed Central PMCID: 2597437.
396. Bellemore SM, Nikoopour E, Schwartz JA, Krougly O, Lee-Chan E, Singh B. Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol*. 2015 Dec;182(3):261-9. PubMed PMID: 26250153. Pubmed Central PMCID: 4636888.
397. Singh B, Schwartz JA, Sandrock C, Bellemore SM, Nikoopour E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *Indian J Med Res*. 2013 Nov;138(5):591-4. PubMed PMID: 24434314. Pubmed Central PMCID: 3928692.
398. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5149-53. PubMed PMID: 15100250.
399. Filippi CM, Juedes AE, Oldham JE, Ling E, Togher L, Peng Y, et al. Transforming growth factor-beta suppresses the activation of CD8+ T-cells when naive but promotes their survival and function once antigen experienced: a two-faced impact on autoimmunity. *Diabetes*. 2008 Oct;57(10):2684-92. PubMed PMID: 18689691. Pubmed Central PMCID: 2551678.
400. Ma C, Zhang N. Transforming growth factor-beta signaling is constantly shaping memory T-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep 1;112(35):11013-7. PubMed PMID: 26283373. Pubmed Central PMCID: 4568277.
401. Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, et al. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol*. 1986 May 15;136(10):3916-20. PubMed PMID: 2871107.
402. Trotta R, Dal Col J, Yu J, Ciarlariello D, Thomas B, Zhang X, et al. TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J Immunol*. 2008 Sep 15;181(6):3784-92. PubMed PMID: 18768831. Pubmed Central PMCID: 2924753.
403. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):4120-5. PubMed PMID: 12646700. Pubmed Central PMCID: 153058.
404. Kaplan DH, Li MO, Jenison MC, Shlomchik WD, Flavell RA, Shlomchik MJ. Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007 Oct 29;204(11):2545-52. PubMed PMID: 17938236. Pubmed Central PMCID: 2118472.

405. Bekeredjian-Ding I, Schafer M, Hartmann E, Pries R, Parcina M, Schneider P, et al. Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology*. 2009 Nov;128(3):439-50. PubMed PMID: 20067543. Pubmed Central PMCID: 2770691.
406. Allen SS, Mackie JT, Russell K, Jeevan A, Skwor TA, McMurray DN. Altered inflammatory responses following transforming growth factor-beta neutralization in experimental guinea pig tuberculous pleurisy. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008 Sep;88(5):430-6. PubMed PMID: 18555747.
407. Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isenmann S, Vadas MA, Gamble JR. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol*. 1996 Jul 1;157(1):360-8. PubMed PMID: 8683138.
408. Shen L, Smith JM, Shen Z, Eriksson M, Sentman C, Wira CR. Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor-beta1. *Clin Exp Immunol*. 2007 Jul;149(1):155-61. PubMed PMID: 17403059. Pubmed Central PMCID: 1942024.
409. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8;16(3):183-94. PubMed PMID: 19732719. Pubmed Central PMCID: 2754404.
410. Trikha P, Carson WE, 3rd. Signaling pathways involved in MDSC regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1846(1):55-65. PubMed PMID: 24727385. Pubmed Central PMCID: 4140957.
411. Ryzhov SV, Pickup MW, Chytil A, Gorska AE, Zhang Q, Owens P, et al. Role of TGF-beta signaling in generation of CD39+CD73+ myeloid cells in tumors. *J Immunol*. 2014 Sep 15;193(6):3155-64. PubMed PMID: 25127858. Pubmed Central PMCID: 4157098.
412. Dong M, Blobe GC. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4589-96. PubMed PMID: 16484590. Pubmed Central PMCID: 1895802.
413. Teicher BA. Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta. *Cancer Metastasis Rev*. 2001;20(1-2):133-43. PubMed PMID: 11831642.
414. Bornstein S, White R, Malkoski S, Oka M, Han G, Cleaver T, et al. Smad4 loss in mice causes spontaneous head and neck cancer with increased genomic instability and inflammation. *J Clin Invest*. 2009 Nov;119(11):3408-19. PubMed PMID: 19841536. Pubmed Central PMCID: 2769185.
415. Slattery ML, Herrick JS, Lundgreen A, Wolff RK. Genetic variation in the TGF-beta signaling pathway and colon and rectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 Jan;20(1):57-69. PubMed PMID: 21068203. Pubmed Central PMCID: 3061458.
416. Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006 Feb-Apr;17(1-2):41-58. PubMed PMID: 16310402.
417. Chang HL, Gillett N, Figari I, Lopez AR, Palladino MA, Derynck R. Increased transforming growth factor beta expression inhibits cell proliferation in vitro, yet increases tumorigenicity and tumor growth of Meth A sarcoma cells. *Cancer Res*. 1993 Sep 15;53(18):4391-8. PubMed PMID: 8364935.
418. Dong M, How T, Kirkbride KC, Gordon KJ, Lee JD, Hempel N, et al. The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):206-17. PubMed PMID: 17160136. Pubmed Central PMCID: 1679965.
419. Malkoski SP, Wang XJ. Two sides of the story? Smad4 loss in pancreatic cancer versus head-and-neck cancer. *FEBS letters*. 2012 Jul 4;586(14):1984-92. PubMed PMID: 22321641. Pubmed Central PMCID: 3285395.
420. Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, et al. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 2008 Apr 4;133(1):66-77. PubMed PMID: 18394990. Pubmed Central PMCID: PMC2390892.

421. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 2000 May 4;342(18):1350-8. PubMed PMID: 10793168.
422. Galliher AJ, Schiemann WP. Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):R42. PubMed PMID: 16859511. Pubmed Central PMCID: 1779461.
423. Novitskiy SV, Pickup MW, Chytil A, Polosukhina D, Owens P, Moses HL. Deletion of TGF-beta signaling in myeloid cells enhances their anti-tumorigenic properties. *J Leukoc Biol*. 2012 Sep;92(3):641-51. PubMed PMID: 22685318. Pubmed Central PMCID: 3427612.
424. Colak S, Ten Dijke P. Targeting TGF-beta Signaling in Cancer. *Trends Cancer*. 2017 Jan;3(1):56-71. PubMed PMID: 28718426.
425. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2015 Mar;147:22-31. PubMed PMID: 25444759.
426. Garrison K, Hahn T, Lee WC, Ling LE, Weinberg AD, Akporiaye ET. The small molecule TGF-beta signaling inhibitor SM16 synergizes with agonistic OX40 antibody to suppress established mammary tumors and reduce spontaneous metastasis. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Apr;61(4):511-21. PubMed PMID: 21971588. Pubmed Central PMCID: 3595193.
427. Park J, Wrzesinski SH, Stern E, Look M, Criscione J, Ragheb R, et al. Combination delivery of TGF-beta inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat Mater*. 2012 Oct;11(10):895-905. PubMed PMID: 22797827. Pubmed Central PMCID: 3601683.
428. Hutzen B, Chen CY, Wang PY, Sprague L, Swain HM, Love J, et al. TGF-beta Inhibition Improves Oncolytic Herpes Viroimmunotherapy in Murine Models of Rhabdomyosarcoma. *Mol Ther Oncolytics*. 2017 Dec 15;7:17-26. PubMed PMID: 29034312. Pubmed Central PMCID: 5633823.
429. Takaku S, Terabe M, Ambrosino E, Peng J, Lonning S, McPherson JM, et al. Blockade of TGF-beta enhances tumor vaccine efficacy mediated by CD8(+) T cells. *Int J Cancer*. 2010 Apr 1;126(7):1666-74. PubMed PMID: 19830696. Pubmed Central PMCID: 2818422.
430. Terabe M, Ambrosino E, Takaku S, O'Konek JJ, Venzon D, Lonning S, et al. Synergistic enhancement of CD8+ T cell-mediated tumor vaccine efficacy by an anti-transforming growth factor-beta monoclonal antibody. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 1;15(21):6560-9. PubMed PMID: 19861451. Pubmed Central PMCID: 2804258.
431. Terabe M, Robertson FC, Clark K, De Ravin E, Bloom A, Venzon DJ, et al. Blockade of only TGF-beta 1 and 2 is sufficient to enhance the efficacy of vaccine and PD-1 checkpoint blockade immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2017;6(5):e1308616. PubMed PMID: 28638730. Pubmed Central PMCID: 5467996.
432. Ueda R, Fujita M, Zhu X, Sasaki K, Kasthuber ER, Kohanbash G, et al. Systemic inhibition of transforming growth factor-beta in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 1;15(21):6551-9. PubMed PMID: 19861464. Pubmed Central PMCID: 2783346.
433. Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, et al. TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*. 2018 Feb 22;554(7693):544-8. PubMed PMID: 29443960. Pubmed Central PMCID: PMC6028240.
434. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llargo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGFbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*. 2018 Feb 22;554(7693):538-43. PubMed PMID: 29443964.
435. Foster AE, Dotti G, Lu A, Khalil M, Brenner MK, Heslop HE, et al. Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF-beta receptor. *J Immunother*. 2008 Jun;31(5):500-5. PubMed PMID: 18463534. Pubmed Central PMCID: 2745436.

436. Kloss CC, Lee J, Zhang A, Chen F, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. Dominant-Negative TGF-beta Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication. *Mol Ther*. 2018 Jul 5;26(7):1855-66. PubMed PMID: 29807781. Pubmed Central PMCID: 6037129.
437. Wang L, Wen W, Yuan J, Helfand B, Li Y, Shi C, et al. Immunotherapy for human renal cell carcinoma by adoptive transfer of autologous transforming growth factor beta-insensitive CD8+ T cells. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan 1;16(1):164-73. PubMed PMID: 20028741.
438. Zhang Q, Helfand BT, Carneiro BA, Qin W, Yang XJ, Lee C, et al. Efficacy Against Human Prostate Cancer by Prostate-specific Membrane Antigen-specific, Transforming Growth Factor-beta Insensitive Genetically Targeted CD8(+) T-cells Derived from Patients with Metastatic Castrate-resistant Disease. *Eur Urol*. 2018 May;73(5):648-52. PubMed PMID: 29275833.
439. Bollard CM, Tripic T, Cruz CR, Dotti G, Gottschalk S, Torrano V, et al. Tumor-Specific T-Cells Engineered to Overcome Tumor Immune Evasion Induce Clinical Responses in Patients With Relapsed Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2018 Apr 10;36(11):1128-39. PubMed PMID: 29315015. Pubmed Central PMCID: 5891126.
440. Blank U, Karlsson S. TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2015 Jun 4;125(23):3542-50. PubMed PMID: 25833962.
441. Hinge A, Filippi MD. Deconstructing the Complexity of TGFbeta Signaling in Hematopoietic Stem Cells: Quiescence and Beyond. *Curr Stem Cell Rep*. 2016 Dec;2(4):388-97. PubMed PMID: 28529843. Pubmed Central PMCID: 5436728.
442. Oh SA, Li MO. TGF-beta: guardian of T cell function. *J Immunol*. 2013 Oct 15;191(8):3973-9. PubMed PMID: 24098055. Pubmed Central PMCID: 3856438.
443. Mackay LK, Braun A, Macleod BL, Collins N, Tebartz C, Bedoui S, et al. Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J Immunol*. 2015 Mar 1;194(5):2059-63. PubMed PMID: 25624457.
444. Zhang N, Bevan MJ. Transforming growth factor-beta signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention. *Immunity*. 2013 Oct 17;39(4):687-96. PubMed PMID: 24076049. Pubmed Central PMCID: 3805703.
445. Youngblood B, Hale JS, Kissick HT, Ahn E, Xu X, Wieland A, et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature*. 2017 Dec 21;552(7685):404-9. PubMed PMID: 29236683. Pubmed Central PMCID: PMC5965677.
446. Sukumar M, Liu J, Ji Y, Subramanian M, Crompton JG, Yu Z, et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest*. 2013 Oct;123(10):4479-88. PubMed PMID: 24091329. Pubmed Central PMCID: 3784544.
447. Pilipow K, Scamardella E, Puccio S, Gautam S, De Paoli F, Mazza EM, et al. Antioxidant metabolism regulates CD8+ T memory stem cell formation and antitumor immunity. *JCI Insight*. 2018 Sep 20;3(18). PubMed PMID: 30232291. Pubmed Central PMCID: 6237218.
448. Orio J, Carli C, Janelle V, Giroux M, Taillefer J, Goupil M, et al. Early exposure to interleukin-21 limits rapidly generated anti-Epstein-Barr virus T-cell line differentiation. *Cytotherapy*. 2015 Feb 3;17(4):496-508. PubMed PMID: 25661862.
449. Carli C, Giroux M, Delisle JS. Roles of Transforming Growth Factor-beta in Graft-versus-Host and Graft-versus-Tumor Effects. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Sep;18(9):1329-40. PubMed PMID: 22326303. Epub 2012/02/14. eng.
450. Nakatsukasa H, Zhang D, Maruyama T, Chen H, Cui K, Ishikawa M, et al. The DNA-binding inhibitor Id3 regulates IL-9 production in CD4(+) T cells. *Nat Immunol*. 2015 Oct;16(10):1077-84. PubMed PMID: 26322481. Pubmed Central PMCID: 5935106.

451. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity*. 2007 May;26(5):579-91. PubMed PMID: 17481928. Epub 2007/05/08. eng.
452. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8. PubMed PMID: 16648838. Epub 2006/05/02. eng.
453. Dahmani A, Delisle JS. TGF-beta in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2018 Jun 11;10(6). PubMed PMID: 29891791. Pubmed Central PMCID: PMC6025055.
454. Sanjabi S, Mosaheb MM, Flavell RA. Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity*. 2009 Jul 17;31(1):131-44. PubMed PMID: 19604492. Pubmed Central PMCID: 2765785.
455. Ji Y, Pos Z, Rao M, Klebanoff CA, Yu Z, Sukumar M, et al. Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol*. 2011 Nov 6;12(12):1230-7. PubMed PMID: 22057288. Pubmed Central PMCID: 3226770.
456. Petersen M, Thorikay M, Deckers M, van Dinther M, Grygielko ET, Gellibert F, et al. Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-beta type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney Int*. 2008 Mar;73(6):705-15. PubMed PMID: 18075500. Epub 2007/12/14. eng.
457. Janelle V, Carli C, Taillefer J, Orio J, Delisle JS. Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *Journal of translational medicine*. 2015;13:123. PubMed PMID: 25925868. Pubmed Central PMCID: 4413989.
458. Gudmundsdottir H, Wells AD, Turka LA. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol*. 1999 May 1;162(9):5212-23. PubMed PMID: 10227995. Epub 1999/05/05. eng.
459. Hoeppli RE, MacDonald KN, Leclair P, Fung VCW, Mojibian M, Gillies J, et al. Tailoring the homing capacity of human Tregs for directed migration to sites of Th1-inflammation or intestinal regions. *Am J Transplant*. 2019 Jan;19(1):62-76. PubMed PMID: 29766641.
460. Helsen CW, Hammill JA, Lau VWC, Mwawasi KA, Afsahi A, Bezverbnaya K, et al. The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity. *Nat Commun*. 2018 Aug 3;9(1):3049. PubMed PMID: 30076299. Pubmed Central PMCID: PMC6076291.
461. Rabinovich BA, Ye Y, Etto T, Chen JQ, Levitsky HI, Overwijk WW, et al. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 23;105(38):14342-6. PubMed PMID: 18794521. Pubmed Central PMCID: PMC2567214.
462. Takai S, Schlom J, Tucker J, Tsang KY, Greiner JW. Inhibition of TGF-beta1 signaling promotes central memory T cell differentiation. *J Immunol*. 2013 Sep 1;191(5):2299-307. PubMed PMID: 23904158. Pubmed Central PMCID: 3889640.
463. Icheva V, Kayser S, Wolff D, Tuve S, Kyzirakos C, Bethge W, et al. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 1;31(1):39-48. PubMed PMID: 23169501. Epub 2012/11/22. eng.
464. Benevides L, Costa RS, Tavares LA, Russo M, Martins GA, da Silva LLP, et al. Blimp-1 controls Th9 cell development, IL-9 production and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Aug 7. PubMed PMID: 30096391.
465. Cimmino L, Martins GA, Liao J, Magnusdottir E, Grunig G, Perez RK, et al. Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of *ifng*, *tbx21*, and *bcl6* gene expression. *J Immunol*. 2008 Aug 15;181(4):2338-47. PubMed PMID: 18684923.

466. Das L, Levine AD. TGF-beta inhibits IL-2 production and promotes cell cycle arrest in TCR-activated effector/memory T cells in the presence of sustained TCR signal transduction. *J Immunol.* 2008 Feb 1;180(3):1490-8. PubMed PMID: 18209044.
467. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell.* 2008 Aug 8;134(3):392-404. PubMed PMID: 18692464. Pubmed Central PMCID: PMC3677783.
468. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood.* 2007 Oct 15;110(8):2983-90. PubMed PMID: 17644734. Pubmed Central PMCID: 2018674.
469. Schmidt A, Eriksson M, Shang MM, Weyd H, Tegner J. Comparative Analysis of Protocols to Induce Human CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells by Combinations of IL-2, TGF-beta, Retinoic Acid, Rapamycin and Butyrate. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148474. PubMed PMID: 26886923. Pubmed Central PMCID: 4757416.
470. McMurphy AN, Gillies J, Gizzi MC, Riba M, Garcia-Manteiga JM, Cittaro D, et al. A novel function for FOXP3 in humans: intrinsic regulation of conventional T cells. *Blood.* 2013 Feb 21;121(8):1265-75. PubMed PMID: 23169781.
471. Graef P, Buchholz VR, Stemberger C, Flossdorf M, Henkel L, Schiemann M, et al. Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells. *Immunity.* 2014 Jul 17;41(1):116-26. PubMed PMID: 25035956.
472. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood.* 2014 Jun 12;123(24):3750-9. PubMed PMID: 24782509. Pubmed Central PMCID: PMC4055922.
473. Delisle JS, Giroux M, Boucher G, Landry JR, Hardy MP, Lemieux S, et al. The TGF-beta-Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells. *Genes Immun.* 2013 Jan 17. PubMed PMID: 23328844. Epub 2013/01/19. Eng.
474. Ishigame H, Mosaheb MM, Sanjabi S, Flavell RA. Truncated form of TGF-betaRII, but not its absence, induces memory CD8+ T cell expansion and lymphoproliferative disorder in mice. *J Immunol.* 2013 Jun 15;190(12):6340-50. PubMed PMID: 23686479. Pubmed Central PMCID: PMC3690649.
475. Liu S, Etto T, Rodriguez-Cruz T, Li Y, Wu C, Fulbright OJ, et al. TGF-beta1 induces preferential rapid expansion and persistence of tumor antigen-specific CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother.* 2010 May;33(4):371-81. PubMed PMID: 20386469.
476. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest.* 2014 May;124(5):2246-59. PubMed PMID: 24667641. Pubmed Central PMCID: 4001555.
477. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010 Jun;31(6):220-7. PubMed PMID: 20538542. Epub 2010/06/12. eng.
478. Bollard CM, Rossig C, Calonge MJ, Huls MH, Wagner HJ, Massague J, et al. Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood.* 2002 May 1;99(9):3179-87. PubMed PMID: 11964281. Epub 2002/04/20. eng.
479. Bergsbaken T, Bevan MJ. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8(+) T cells responding to infection. *Nat Immunol.* 2015 Apr;16(4):406-14. PubMed PMID: 25706747. Pubmed Central PMCID: 4368475.
480. Jiang X, Clark RA, Liu L, Wagers AJ, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature.* 2012 Feb 29;483(7388):227-31. PubMed PMID: 22388819. Pubmed Central PMCID: 3437663.

481. Masopust D, Vezyz V, Wherry EJ, Barber DL, Ahmed R. Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population. *J Immunol.* 2006 Feb 15;176(4):2079-83. PubMed PMID: 16455963.
482. Schenkel JM, Fraser KA, Vezyz V, Masopust D. Sensing and alarm function of resident memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol.* 2013 May;14(5):509-13. PubMed PMID: 23542740. Pubmed Central PMCID: 3631432.
483. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature.* 2004 Jan 22;427(6972):355-60. PubMed PMID: 14737169.
484. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res.* 2011 Mar 10;317(5):620-31. PubMed PMID: 21376175. Pubmed Central PMCID: 3065205.
485. Chheda ZS, Sharma RK, Jala VR, Luster AD, Haribabu B. Chemoattractant Receptors BLT1 and CXCR3 Regulate Antitumor Immunity by Facilitating CD8+ T Cell Migration into Tumors. *J Immunol.* 2016 Sep 1;197(5):2016-26. PubMed PMID: 27465528. Pubmed Central PMCID: 4992661.
486. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar 15;12(4):298-306. PubMed PMID: 22419253.
487. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res.* 2009 Apr 1;69(7):3077-85. PubMed PMID: 19293190. Pubmed Central PMCID: 3886718.
488. Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, Kirilovsky A, Bindea G, Berger A, et al. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010 Apr;138(4):1429-40. PubMed PMID: 19909745.
489. Mullins IM, Slingluff CL, Lee JK, Garbee CF, Shu J, Anderson SG, et al. CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease. *Cancer Res.* 2004 Nov 1;64(21):7697-701. PubMed PMID: 15520172.
490. Yoneyama H, Narumi S, Zhang Y, Murai M, Baggiolini M, Lanzavecchia A, et al. Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *The Journal of experimental medicine.* 2002 May 20;195(10):1257-66. PubMed PMID: 12021306. Pubmed Central PMCID: 2193754.
491. Park SL, Mackay LK, Gebhardt T. Distinct recirculation potential of CD69(+)CD103(-) and CD103(+) thymic memory CD8(+) T cells. *Immunol Cell Biol.* 2016 Nov;94(10):975-80. PubMed PMID: 27328704.
492. Wakim LM, Woodward-Davis A, Liu R, Hu Y, Villadangos J, Smyth G, et al. The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. *J Immunol.* 2012 Oct 1;189(7):3462-71. PubMed PMID: 22922816. Pubmed Central PMCID: 3884813.
493. Laidlaw BJ, Zhang N, Marshall HD, Staron MM, Guan T, Hu Y, et al. CD4+ T cell help guides formation of CD103+ lung-resident memory CD8+ T cells during influenza viral infection. *Immunity.* 2014 Oct 16;41(4):633-45. PubMed PMID: 25308332. Pubmed Central PMCID: 4324721.
494. Kadow S, Jux B, Zahner SP, Wingerath B, Chmill S, Clausen BE, et al. Aryl hydrocarbon receptor is critical for homeostasis of invariant gammadelta T cells in the murine epidermis. *J Immunol.* 2011 Sep 15;187(6):3104-10. PubMed PMID: 21844385.
495. Zaid A, Mackay LK, Rahimpour A, Braun A, Veldhoen M, Carbone FR, et al. Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 8;111(14):5307-12. PubMed PMID: 24706879. Pubmed Central PMCID: 3986170.
496. Waickman AT, Powell JD. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *Immunol Rev.* 2012 Sep;249(1):43-58. PubMed PMID: 22889214. Pubmed Central PMCID: PMC3419491.

497. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Dec 15;198(12):1875-86. PubMed PMID: 14676299. Pubmed Central PMCID: 2194145.
498. Pang MF, Georgoudaki AM, Lambut L, Johansson J, Tabor V, Hagikura K, et al. TGF-beta1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene*. 2016 Feb 11;35(6):748-60. PubMed PMID: 25961925. Pubmed Central PMCID: PMC4753256.
499. Cheung KW, Wu T, Ho SF, Wong YC, Liu L, Wang H, et al. alpha4beta7(+) CD4(+) Effector/Effector Memory T Cells Differentiate into Productively and Latently Infected Central Memory T Cells by Transforming Growth Factor beta1 during HIV-1 Infection. *J Virol*. 2018 Apr 15;92(8). PubMed PMID: 29386290. Pubmed Central PMCID: 5874435.
500. Brinkman CC, Peske JD, Engelhard VH. Peripheral tissue homing receptor control of naive, effector, and memory CD8 T cell localization in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Front Immunol*. 2013;4:241. PubMed PMID: 23966998. Pubmed Central PMCID: 3746678.
501. Bachireddy P, Hainz U, Rooney M, Pozdnyakova O, Aldridge J, Zhang W, et al. Reversal of in situ T-cell exhaustion during effective human antileukemia responses to donor lymphocyte infusion. *Blood*. 2014 Feb 27;123(9):1412-21. PubMed PMID: 24357730. Pubmed Central PMCID: 3938152.
502. Yang ZZ, Grote DM, Xiu B, Ziesmer SC, Price-Troska TL, Hodge LS, et al. TGF-beta upregulates CD70 expression and induces exhaustion of effector memory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2014 Sep;28(9):1872-84. PubMed PMID: 24569779. Pubmed Central PMCID: 4145058.
503. John SA, Garrett-Sinha LA. Blimp1: a conserved transcriptional repressor critical for differentiation of many tissues. *Exp Cell Res*. 2009 Apr 15;315(7):1077-84. PubMed PMID: 19073176.
504. Kallies A, Hawkins ED, Belz GT, Metcalf D, Hommel M, Corcoran LM, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat Immunol*. 2006 May;7(5):466-74. PubMed PMID: 16565720.
505. Rutishauser RL, Martins GA, Kalachikov S, Chandele A, Parish IA, Meffre E, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity*. 2009 Aug 21;31(2):296-308. PubMed PMID: 19664941. Pubmed Central PMCID: 2783637.
506. Shin H, Blackburn SD, Intlekofer AM, Kao C, Angelosanto JM, Reiner SL, et al. A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 2009 Aug 21;31(2):309-20. PubMed PMID: 19664943. Pubmed Central PMCID: 2747257.
507. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 2003 Oct 31;115(3):281-92. PubMed PMID: 14636556.
508. D'Cruz LM, Lind KC, Wu BB, Fujimoto JK, Goldrath AW. Loss of E protein transcription factors E2A and HEB delays memory-precursor formation during the CD8+ T-cell immune response. *Eur J Immunol*. 2012 Aug;42(8):2031-41. PubMed PMID: 22585759. Pubmed Central PMCID: 3702188.
509. Benevides L, Costa RS, Tavares LA, Russo M, Martins GA, da Silva LLP, et al. B lymphocyte-induced maturation protein 1 controls TH9 cell development, IL-9 production, and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Mar;143(3):1119-30 e3. PubMed PMID: 30096391.
510. Chandran PA, Keller A, Weinmann L, Seida AA, Braun M, Andreev K, et al. The TGF-beta-inducible miR-23a cluster attenuates IFN-gamma levels and antigen-specific cytotoxicity in human CD8(+) T cells. *J Leukoc Biol*. 2014 Oct;96(4):633-45. PubMed PMID: 25030422.

511. Kee BL, Rivera RR, Murre C. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta. *Nat Immunol.* 2001 Mar;2(3):242-7. PubMed PMID: 11224524.
512. Izumi N, Mizuguchi S, Inagaki Y, Saika S, Kawada N, Nakajima Y, et al. BMP-7 opposes TGF-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jan;290(1):L120-6. PubMed PMID: 16126788.
513. Kowanetz M, Valcourt U, Bergstrom R, Heldin CH, Moustakas A. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Mol Cell Biol.* 2004 May;24(10):4241-54. PubMed PMID: 15121845. Pubmed Central PMCID: 400464.
514. Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol.* 2006 Feb;69(2):597-607. PubMed PMID: 16288083.
515. Maruyama T, Li J, Vaque JP, Konkel JE, Wang W, Zhang B, et al. Control of the differentiation of regulatory T cells and T(H)17 cells by the DNA-binding inhibitor Id3. *Nat Immunol.* 2011 Jan;12(1):86-95. PubMed PMID: 21131965. Pubmed Central PMCID: 3140164.
516. Rao RR, Li Q, Gubbels Bupp MR, Shrikant PA. Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity.* 2012 Mar 23;36(3):374-87. PubMed PMID: 22425248. Pubmed Central PMCID: 3314246.
517. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science.* 2002 Jan 11;295(5553):338-42. PubMed PMID: 11786644.
518. Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG, et al. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *The Journal of experimental medicine.* 2009 Jan 16;206(1):51-9. PubMed PMID: 19139168. Pubmed Central PMCID: 2626671.
519. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, et al. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol.* 2005 Dec;6(12):1236-44. PubMed PMID: 16273099.
520. Park IK, Shultz LD, Letterio JJ, Gorham JD. TGF-beta1 inhibits T-bet induction by IFN-gamma in murine CD4+ T cells through the protein tyrosine phosphatase Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1. *J Immunol.* 2005 Nov 1;175(9):5666-74. PubMed PMID: 16237056.
521. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2007 Jan;37(1):129-38. PubMed PMID: 17154262.
522. Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol.* 2007 Jan;37(1):21-3. PubMed PMID: 17183612.
523. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 5;102(14):5138-43. PubMed PMID: 15790681. Pubmed Central PMCID: 555574.
524. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell.* 2006 Jul 28;126(2):375-87. PubMed PMID: 16873067.
525. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:707-47. PubMed PMID: 9143705.

526. Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol*. 2006 Mar 15;176(6):3593-602. PubMed PMID: 16517728.
527. Lozano T, Villanueva L, Durantez M, Gorraiz M, Ruiz M, Belsue V, et al. Inhibition of FOXP3/NFAT Interaction Enhances T Cell Function after TCR Stimulation. *J Immunol*. 2015 Oct 1;195(7):3180-9. PubMed PMID: 26324768.
528. McKarns SC, Schwartz RH. Distinct effects of TGF-beta 1 on CD4+ and CD8+ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3. *J Immunol*. 2005 Feb 15;174(4):2071-83. PubMed PMID: 15699137.
529. Inge TH, Hoover SK, Susskind BM, Barrett SK, Bear HD. Inhibition of tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res*. 1992 Mar 15;52(6):1386-92. PubMed PMID: 1531782.
530. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5215-23. PubMed PMID: 15843517. Pubmed Central PMCID: 2562293.
531. Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA, Jr. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*. 1987 Oct 1;166(4):991-8. PubMed PMID: 3498791. Pubmed Central PMCID: 2188710.
532. Xu H, Silver PB, Tarrant TK, Chan CC, Caspi RR. Tgf-beta inhibits activation and uveitogenicity of primary but not of fully polarized retinal antigen-specific memory-effector T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Nov;44(11):4805-12. PubMed PMID: 14578402.
533. Rich S, Seelig M, Lee HM, Lin J. Transforming growth factor beta 1 costimulated growth and regulatory function of staphylococcal enterotoxin B-responsive CD8+ T cells. *J Immunol*. 1995 Jul 15;155(2):609-18. PubMed PMID: 7608539.
534. Zhang X, Giangreco L, Broome HE, Dargan CM, Swain SL. Control of CD4 effector fate: transforming growth factor beta 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. *The Journal of experimental medicine*. 1995 Sep 1;182(3):699-709. PubMed PMID: 7650478. Pubmed Central PMCID: 2192155.
535. Gunnlaugsdottir B, Maggadottir SM, Ludviksson BR. Anti-CD28-induced co-stimulation and TCR avidity regulates the differential effect of TGF-beta1 on CD4+ and CD8+ naive human T-cells. *Int Immunol*. 2005 Jan;17(1):35-44. PubMed PMID: 15557315.
536. Kim YJ, Stringfield TM, Chen Y, Broxmeyer HE. Modulation of cord blood CD8+ T-cell effector differentiation by TGF-beta1 and 4-1BB costimulation. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):274-81. PubMed PMID: 15353478.
537. Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1508-14. PubMed PMID: 14734728.
538. Geller RL, Smyth MJ, Strobl SL, Bach FH, Ruscetti FW, Longo DL, et al. Generation of lymphokine-activated killer activity in T cells. Possible regulatory circuits. *J Immunol*. 1991 May 15;146(10):3280-8. PubMed PMID: 1673980.
539. Cerwenka A, Kovar H, Majdic O, Holter W. Fas- and activation-induced apoptosis are reduced in human T cells preactivated in the presence of TGF-beta 1. *J Immunol*. 1996 Jan 15;156(2):459-64. PubMed PMID: 8543794.
540. Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-

- Myc. *The Journal of experimental medicine*. 1999 Jan 18;189(2):231-9. PubMed PMID: 9892606. Pubmed Central PMCID: 2192981.
541. Han Q, Bagheri N, Bradshaw EM, Hafler DA, Lauffenburger DA, Love JC. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 31;109(5):1607-12. PubMed PMID: 22160692. Pubmed Central PMCID: 3277116.
542. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2005 Apr 4;201(7):1061-7. PubMed PMID: 15809351. Pubmed Central PMCID: 2213134.
543. Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *J Immunol*. 2005 Feb 1;174(3):1446-55. PubMed PMID: 15661903.
544. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 25;103(17):6659-64. PubMed PMID: 16617117. Pubmed Central PMCID: 1458937.
545. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol*. 2005 Jan;66(1):13-20. PubMed PMID: 15620457.
546. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol*. 2009 Feb;9(2):83-9. PubMed PMID: 19114986.
547. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*. 2007 Apr;19(4):345-54. PubMed PMID: 17329235.
548. Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol*. 2007 Apr;123(1):18-29. PubMed PMID: 17185041. Pubmed Central PMCID: 1868523.
549. Walker MR, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(9):1437-43. PubMed PMID: 14597769. Pubmed Central PMCID: 228469.
550. Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One*. 2011;6(8):e24226. PubMed PMID: 21918685. Pubmed Central PMCID: 3168881.
551. Rieder SA, Metidji A, Glass DD, Thornton AM, Ikeda T, Morgan BA, et al. Eos Is Redundant for Regulatory T Cell Function but Plays an Important Role in IL-2 and Th17 Production by CD4+ Conventional T Cells. *J Immunol*. 2015 Jul 15;195(2):553-63. PubMed PMID: 26062998. Pubmed Central PMCID: 4491037.
552. Battle E, Massague J. Transforming Growth Factor-beta Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):924-40. PubMed PMID: 30995507.
553. Melisi D, Garcia-Carbonero R, Macarulla T, Pezet D, Deplanque G, Fuchs M, et al. Galunisertib plus gemcitabine vs. gemcitabine for first-line treatment of patients with unresectable pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2018 Nov;119(10):1208-14. PubMed PMID: 30318515.
554. Sandrine J. Faivre AS, Robin Kate Kelley, Philippe Merle, Ed Gane, Jean-Yves DouillardDirk Waldschmidt, Mary Frances Mulcahy, Charlotte Costentin, Beatriz Minguez, Pasqua Papappicco, Ivelina Gueorguieva, Ann Cleverly, Durisala Desaiyah, Michael M. Lahn, Sophie Ameryckx, Karim A. Benhadji, Eric Raymond, Gianluigi Giannelli. A phase 2 study of a novel transforming growth factor-beta (TGF- β 1) receptor I kinase inhibitor, LY2157299 monohydrate (LY), in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *Journal Of Clinical oncology*. 2017.

555. Holmgaard RB, Schaer DA, Li Y, Castaneda SP, Murphy MY, Xu X, et al. Targeting the TGFbeta pathway with galunisertib, a TGFbetaRI small molecule inhibitor, promotes anti-tumor immunity leading to durable, complete responses, as monotherapy and in combination with checkpoint blockade. *J Immunother Cancer*. 2018 Jun 4;6(1):47. PubMed PMID: 29866156. Pubmed Central PMCID: 5987416.
556. Nakanishi Y, Duran A, L'Hermitte A, Shelton PM, Nakanishi N, Reina-Campos M, et al. Simultaneous Loss of Both Atypical Protein Kinase C Genes in the Intestinal Epithelium Drives Serrated Intestinal Cancer by Impairing Immunosurveillance. *Immunity*. 2018 Dec 18;49(6):1132-47 e7. PubMed PMID: 30552022. Pubmed Central PMCID: PMC6301096.
557. Ravi R, Noonan KA, Pham V, Bedi R, Zhavoronkov A, Ozerov IV, et al. Bifunctional immune checkpoint-targeted antibody-ligand traps that simultaneously disable TGFbeta enhance the efficacy of cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2018 Feb 21;9(1):741. PubMed PMID: 29467463. Pubmed Central PMCID: 5821872.
558. Bendle GM, Linnemann C, Bies L, Song JY, Schumacher TN. Blockade of TGF-beta signaling greatly enhances the efficacy of TCR gene therapy of cancer. *J Immunol*. 2013 Sep 15;191(6):3232-9. PubMed PMID: 23940272.
559. Mokrani M, Klibi J, Bluteau D, Bismuth G, Mami-Chouaib F. Smad and NFAT pathways cooperate to induce CD103 expression in human CD8 T lymphocytes. *J Immunol*. 2014 Mar 1;192(5):2471-9. PubMed PMID: 24477908.
560. Malik BT, Byrne KT, Vella JL, Zhang P, Shabaneh TB, Steinberg SM, et al. Resident memory T cells in the skin mediate durable immunity to melanoma. *Sci Immunol*. 2017 Apr 14;2(10). PubMed PMID: 28738020. Pubmed Central PMCID: 5525335.
561. Mikucki ME, Fisher DT, Matsuzaki J, Skitzki JJ, Gaulin NB, Muhitch JB, et al. Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints. *Nat Commun*. 2015 Jun 25;6:7458. PubMed PMID: 26109379. Pubmed Central PMCID: PMC4605273.
562. Zhang Y, Maksimovic J, Huang B, De Souza DP, Naselli G, Chen H, et al. Cord Blood CD8(+) T Cells Have a Natural Propensity to Express IL-4 in a Fatty Acid Metabolism and Caspase Activation-Dependent Manner. *Front Immunol*. 2018;9:879. PubMed PMID: 29922282. Pubmed Central PMCID: 5996926.
563. Lim SP, Leung E, Krissansen GW. The beta7 integrin gene (*Itgb-7*) promoter is responsive to TGF-beta1: defining control regions. *Immunogenetics*. 1998 Aug;48(3):184-95. PubMed PMID: 9683663.
564. Robinson PW, Green SJ, Carter C, Coadwell J, Kilshaw PJ. Studies on transcriptional regulation of the mucosal T-cell integrin alphaEbeta7 (CD103). *Immunology*. 2001 Jun;103(2):146-54. PubMed PMID: 11412301. Pubmed Central PMCID: 1783235.
565. Franciszkiwicz K, Boissonnas A, Boutet M, Combadiere C, Mami-Chouaib F. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res*. 2012 Dec 15;72(24):6325-32. PubMed PMID: 23222302.
566. Sharma RK, Chheda ZS, Jala VR, Haribabu B. Regulation of cytotoxic T-Lymphocyte trafficking to tumors by chemoattractants: implications for immunotherapy. *Expert Rev Vaccines*. 2015 Apr;14(4):537-49. PubMed PMID: 25482400.
567. Chow MT, Luster AD. Chemokines in cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014 Dec;2(12):1125-31. PubMed PMID: 25480554. Pubmed Central PMCID: 4258879.
568. Clancy-Thompson E, Perekslis TJ, Croteau W, Alexander MP, Chabanet TB, Turk MJ, et al. Melanoma Induces, and Adenosine Suppresses, CXCR3-Cognate Chemokine Production and T-cell

Infiltration of Lungs Bearing Metastatic-like Disease. *Cancer Immunol Res.* 2015 Aug;3(8):956-67. PubMed PMID: 26048575. Pubmed Central PMCID: 4527878.

569. Ma C, Mishra S, Demel EL, Liu Y, Zhang N. TGF-beta Controls the Formation of Kidney-Resident T Cells via Promoting Effector T Cell Extravasation. *J Immunol.* 2017 Jan 15;198(2):749-56. PubMed PMID: 27903738. Pubmed Central PMCID: PMC5225110.

570. Lefrancois L, Parker CM, Olson S, Muller W, Wagner N, Schon MP, et al. The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *The Journal of experimental medicine.* 1999 May 17;189(10):1631-8. PubMed PMID: 10330442. Pubmed Central PMCID: 2193647.

571. Wagner N, Lohler J, Kunkel EJ, Ley K, Leung E, Krissansen G, et al. Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature.* 1996 Jul 25;382(6589):366-70. PubMed PMID: 8684468.

572. Schon MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, et al. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol.* 1999 Jun 1;162(11):6641-9. PubMed PMID: 10352281.

573. Franciszkiwicz K, Le Floc'h A, Boutet M, Vergnon I, Schmitt A, Mami-Chouaib F. CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. *Cancer Res.* 2013 Jan 15;73(2):617-28. PubMed PMID: 23188505.

574. Boutet M, Gauthier L, Leclerc M, Gros G, de Montpreville V, Theret N, et al. TGFbeta Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 2016 Apr 1;76(7):1757-69. PubMed PMID: 26921343.

575. Salmon H, Franciszkiwicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest.* 2012 Mar;122(3):899-910. PubMed PMID: 22293174. Pubmed Central PMCID: 3287213.

576. Franciszkiwicz K, Le Floc'h A, Jalil A, Vigant F, Robert T, Vergnon I, et al. Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention. *Cancer Res.* 2009 Aug 1;69(15):6249-55. PubMed PMID: 19638592.

577. Kutlesa S, Wessels JT, Speiser A, Steiert I, Muller CA, Klein G. E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation. *J Cell Sci.* 2002 Dec 1;115(Pt 23):4505-15. PubMed PMID: 12414996.

578. Le Floc'h A, Jalil A, Franciszkiwicz K, Validire P, Vergnon I, Mami-Chouaib F. Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a phospholipase Cgamma-dependent pathway. *Cancer Res.* 2011 Jan 15;71(2):328-38. PubMed PMID: 21224355.

579. Le Floc'h A, Jalil A, Vergnon I, Le Maux Chansac B, Lazar V, Bismuth G, et al. Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *The Journal of experimental medicine.* 2007 Mar 19;204(3):559-70. PubMed PMID: 17325197. Pubmed Central PMCID: 2137907.

580. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 1999 Oct 1;99(1):23-33. PubMed PMID: 10520991.

581. Potsch C, Vohringer D, Pircher H. Distinct migration patterns of naive and effector CD8 T cells in the spleen: correlation with CCR7 receptor expression and chemokine reactivity. *Eur J Immunol.* 1999 Nov;29(11):3562-70. PubMed PMID: 10556810.

582. Soto H, Wang W, Strieter RM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):8205-10. PubMed PMID: 9653165. Pubmed Central PMCID: PMC20954.
583. Hamzah J, Altin JG, Herrington T, Parish CR, Hammerling GJ, O'Donoghue H, et al. Targeted liposomal delivery of TLR9 ligands activates spontaneous antitumor immunity in an autochthonous cancer model. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):1091-8. PubMed PMID: 19561111.
584. Muthuswamy R, Berk E, Junecko BF, Zeh HJ, Zureikat AH, Normolle D, et al. NF-kappaB hyperactivation in tumor tissues allows tumor-selective reprogramming of the chemokine microenvironment to enhance the recruitment of cytolytic T effector cells. *Cancer Res*. 2012 Aug 1;72(15):3735-43. PubMed PMID: 22593190. Pubmed Central PMCID: 3780565.
585. Li H, Chiappinelli KB, Guzzetta AA, Easwaran H, Yen RW, Vatahalli R, et al. Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. *Oncotarget*. 2014 Feb 15;5(3):587-98. PubMed PMID: 24583822. Pubmed Central PMCID: 3996658.
586. Wang L, Amoozgar Z, Huang J, Saleh MH, Xing D, Orsulic S, et al. Decitabine Enhances Lymphocyte Migration and Function and Synergizes with CTLA-4 Blockade in a Murine Ovarian Cancer Model. *Cancer Immunol Res*. 2015 Sep;3(9):1030-41. PubMed PMID: 26056145.
587. Arenberg DA, White ES, Burdick MD, Strom SR, Strieter RM. Improved survival in tumor-bearing SCID mice treated with interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10). *Cancer Immunol Immunother*. 2001 Dec;50(10):533-8. PubMed PMID: 11776375.
588. Liu Y, Huang H, Saxena A, Xiang J. Intratumoral coinjection of two adenoviral vectors expressing functional interleukin-18 and inducible protein-10, respectively, synergizes to facilitate regression of established tumors. *Cancer Gene Ther*. 2002 Jun;9(6):533-42. PubMed PMID: 12032664.
589. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol*. 2017;8:561. PubMed PMID: 28878676. Pubmed Central PMCID: 5572324.
590. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 2;107(9):4275-80. PubMed PMID: 20160101. Pubmed Central PMCID: 2840093.
591. David CJ, Massague J. Contextual determinants of TGFbeta action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Apr 11. PubMed PMID: 29643418.
592. Gaarenstroom T, Hill CS. TGF-beta signaling to chromatin: how Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014 Aug;32:107-18. PubMed PMID: 24503509.
593. Savage-Dunn C. TGF-beta signaling. *WormBook*. 2005:1-12. PubMed PMID: 18050404. Epub 2007/12/01. eng.
594. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Apr;19(2):176-84. PubMed PMID: 17317136. Epub 2007/02/24. eng.
595. Clarke DC, Liu X. Decoding the quantitative nature of TGF-beta/Smad signaling. *Trends Cell Biol*. 2008 Sep;18(9):430-42. PubMed PMID: 18706811. Epub 2008/08/19. eng.
596. Chen YG. Endocytic regulation of TGF-beta signaling. *Cell Res*. 2009 Jan;19(1):58-70. PubMed PMID: 19050695. Epub 2008/12/04. eng.
597. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*. 2009 Jan;19(1):128-39. PubMed PMID: 19114990. Epub 2008/12/31. eng.
598. Mu Y, Gudey SK, Landstrom M. Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res*. 2011 Jun 24. PubMed PMID: 21701805. Epub 2011/06/28. Eng.

599. Ayyaz A, Attisano L, Wrana JL. Recent advances in understanding contextual TGFbeta signaling. *F1000Res*. 2017;6:749. PubMed PMID: 28649369. Pubmed Central PMCID: PMC5464225.
600. Tian M, Neil JR, Schiemann WP. Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer. *Cell Signal*. 2011 Jun;23(6):951-62. PubMed PMID: 20940046. Epub 2010/10/14. eng.
601. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):137-48. PubMed PMID: 15308095. Epub 2004/08/17. eng.
602. Pickup MW, Owens P, Moses HL. TGF-beta, Bone Morphogenetic Protein, and Activin Signaling and the Tumor Microenvironment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 May 1;9(5). PubMed PMID: 28062564.
603. Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM. Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol*. 2011 Dec 20;29(36):4828-36. PubMed PMID: 22042955. Epub 2011/11/02. eng.
604. Travis MA, Sheppard D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:51-82. PubMed PMID: 24313777. Pubmed Central PMCID: PMC4010192.
605. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):455-71. PubMed PMID: 16973386. Epub 2006/09/16. eng.
606. Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):441-54. PubMed PMID: 16973387. Epub 2006/09/16. eng.
607. Yang Z, Mu Z, Dabovic B, Jurukovski V, Yu D, Sung J, et al. Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *J Cell Biol*. 2007 Mar 12;176(6):787-93. PubMed PMID: 17353357. Pubmed Central PMCID: PMC2064053.
608. Travis MA, Reizis B, Melton AC, Masteller E, Tang Q, Proctor JM, et al. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature*. 2007 Sep 20;449(7160):361-5. PubMed PMID: 17694047. Pubmed Central PMCID: PMC2670239.
609. Worthington JJ, Czajkowska BI, Melton AC, Travis MA. Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor-beta and induce Foxp3+ regulatory T cells via integrin alphavbeta8. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1802-12. PubMed PMID: 21723222. Pubmed Central PMCID: PMC3507624.
610. Melton AC, Bailey-Bucktrout SL, Travis MA, Fife BT, Bluestone JA, Sheppard D. Expression of alphavbeta8 integrin on dendritic cells regulates Th17 cell development and experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Clin Invest*. 2010 Dec;120(12):4436-44. PubMed PMID: 21099117. Pubmed Central PMCID: PMC2993595.
611. Wang R, Wan Q, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS One*. 2008 Jul 16;3(7):e2705. PubMed PMID: 18628982. Pubmed Central PMCID: PMC2442191.
612. Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol*. 2009 Dec;39(12):3315-22. PubMed PMID: 19750484.
613. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11;106(32):13445-50. PubMed PMID: 19651619. Pubmed Central PMCID: PMC2726354.
614. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11;106(32):13439-44. PubMed PMID: 19666573. Pubmed Central PMCID: PMC2726405.

615. Edwards JP, Thornton AM, Shevach EM. Release of active TGF-beta1 from the latent TGF-beta1/GARP complex on T regulatory cells is mediated by integrin beta8. *J Immunol.* 2014 Sep 15;193(6):2843-9. PubMed PMID: 25127859. Pubmed Central PMCID: PMC4157079.
616. Worthington JJ, Kelly A, Smedley C, Bauche D, Campbell S, Marie JC, et al. Integrin alphavbeta8-Mediated TGF-beta Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity.* 2015 May 19;42(5):903-15. PubMed PMID: 25979421. Pubmed Central PMCID: PMC4448149.
617. Zhang N, Bevan MJ. TGF-beta signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation. *Nat Immunol.* 2012 May 27;13(7):667-73. PubMed PMID: 22634866. Epub 2012/05/29. Eng.
618. Lucas PJ, McNeil N, Hilgenfeld E, Choudhury B, Kim SJ, Eckhaus MA, et al. Transforming growth factor-beta pathway serves as a primary tumor suppressor in CD8+ T cell tumorigenesis. *Cancer Res.* 2004 Sep 15;64(18):6524-9. PubMed PMID: 15374963.
619. Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell.* 1998 Sep 18;94(6):703-14. PubMed PMID: 9753318. Epub 1998/09/30. eng.
620. Hahn JN, Falck VG, Jirik FR. Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17-associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice. *J Clin Invest.* 2011 Oct;121(10):4030-42. PubMed PMID: 21881210. Pubmed Central PMCID: PMC3195457.
621. Chabanon A, Desterke C, Rodenburger E, Clay D, Guerton B, Boutin L, et al. A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor-beta controls the quiescence/cycling switch of CD34(+) progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin. *Stem Cells.* 2008 Dec;26(12):3150-61. PubMed PMID: 18757300. Epub 2008/09/02. eng.
622. Jiang L, Han X, Wang J, Wang C, Sun X, Xie J, et al. SHP-1 regulates hematopoietic stem cell quiescence by coordinating TGF-beta signaling. *J Exp Med.* 2018 May 7;215(5):1337-47. PubMed PMID: 29669741. Pubmed Central PMCID: PMC5940262.
623. Li L, Iwamoto Y, Berezovskaya A, Boussiotis VA. A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27Kip1 and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance. *Nat Immunol.* 2006 Nov;7(11):1157-65. PubMed PMID: 17013388. Epub 2006/10/03. eng.
624. Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J.* 1999 Mar 1;18(5):1280-91. PubMed PMID: 10064594. Pubmed Central PMCID: 1171218.
625. Giroux M, Delisle JS, Gauthier SD, Heinonen KM, Hingsinger J, Houde B, et al. SMAD3 prevents graft-versus-host disease by restraining Th1 differentiation and granulocyte-mediated tissue damage. *Blood.* 2011 Feb 3;117(5):1734-44. PubMed PMID: 21119112. Epub 2010/12/02. eng.
626. Viel S, Marcais A, Guimaraes FS, Loftus R, Rabilloud J, Grau M, et al. TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal.* 2016 Feb 16;9(415):ra19. PubMed PMID: 26884601.
627. Riese MJ, Wang LC, Moon EK, Joshi RP, Ranganathan A, June CH, et al. Enhanced effector responses in activated CD8+ T cells deficient in diacylglycerol kinases. *Cancer Res.* 2013 Jun 15;73(12):3566-77. PubMed PMID: 23576561. Pubmed Central PMCID: PMC3686869.
628. Giroux M, Delisle JS, O'Brien A, Hebert MJ, Perreault C. T cell activation leads to protein kinase C theta-dependent inhibition of TGF-beta signaling. *J Immunol.* 2010 Aug 1;185(3):1568-76. PubMed PMID: 20592275. Epub 2010/07/02. eng.
629. Cottrez F, Groux H. Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):773-8. PubMed PMID: 11441082.

630. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med.* 2001 Oct;7(10):1118-22. PubMed PMID: 11590434. Epub 2001/10/09. eng.
631. Donkor MK, Sarkar A, Savage PA, Franklin RA, Johnson LK, Jungbluth AA, et al. T cell surveillance of oncogene-induced prostate cancer is impeded by T cell-derived TGF-beta1 cytokine. *Immunity.* 2011 Jul 22;35(1):123-34. PubMed PMID: 21757379. Epub 2011/07/16. eng.
632. Chou CK, Schietinger A, Liggitt HD, Tan X, Funk S, Freeman GJ, et al. Cell-intrinsic abrogation of TGF-beta signaling delays but does not prevent dysfunction of self/tumor-specific CD8 T cells in a murine model of autochthonous prostate cancer. *J Immunol.* 2012 Oct 15;189(8):3936-46. PubMed PMID: 22984076. Pubmed Central PMCID: PMC3466379.
633. Sullivan BM, Juedes A, Szabo SJ, von Herrath M, Glimcher LH. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 23;100(26):15818-23. PubMed PMID: 14673093. Pubmed Central PMCID: PMC307651.
634. Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, et al. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science.* 2008 Jul 18;321(5887):408-11. PubMed PMID: 18635804. Pubmed Central PMCID: PMC2807624.
635. Zhu Y, Ju S, Chen E, Dai S, Li C, Morel P, et al. T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *J Immunol.* 2010 Sep 15;185(6):3174-83. PubMed PMID: 20713880.
636. Kallies A, Xin A, Belz GT, Nutt SL. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity.* 2009 Aug 21;31(2):283-95. PubMed PMID: 19664942.
637. Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, et al. An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 2011 May 15;22(10):1686-98. PubMed PMID: 21411626. Pubmed Central PMCID: PMC3093321.
638. Larsen JE, Nathan V, Osborne JK, Farrow RK, Deb D, Sullivan JP, et al. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest.* 2016 Sep 1;126(9):3219-35. PubMed PMID: 27500490. Pubmed Central PMCID: PMC5004933.
639. Rateitschak K, Kaderali L, Wolkenhauer O, Jaster R. Autocrine TGF-beta/ZEB/microRNA-200 signal transduction drives epithelial-mesenchymal transition: Kinetic models predict minimal drug dose to inhibit metastasis. *Cell Signal.* 2016 Aug;28(8):861-70. PubMed PMID: 27000495.
640. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations *Annu Rev Immunol.* 2010 Mar;28:445-89. PubMed PMID: 20192806. Epub 2010/03/03. eng.
641. Selvaraj RK, Geiger TL. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol.* 2007 Jul 15;179(2):11 p following 1390. PubMed PMID: 17695668. Epub 2007/08/19. eng.
642. Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30;101(13):4572-7. PubMed PMID: 15070759. Pubmed Central PMCID: 384788.
643. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol.* 2012;3:51. PubMed PMID: 22566933. Pubmed Central PMCID: PMC3341960.
644. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol.* 2008 Feb;9(2):194-202. PubMed PMID: 18157133. Epub 2007/12/25. eng.
645. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell

proliferation. *J Exp Med*. 2005 Oct 3;202(7):919-29. PubMed PMID: 16186184. Pubmed Central PMCID: PMC2213166.

646. Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):4488-95. PubMed PMID: 16618776.

647. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2883-92. PubMed PMID: 17312132.

648. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol*. 2014;5:276. PubMed PMID: 24987392. Pubmed Central PMCID: PMC4060300.

649. Hasan M, Neumann B, Hauptelshofer S, Stahlke S, Fantini MC, Angstwurm K, et al. Activation of TGF-beta-induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. *Immunol Cell Biol*. 2015 Aug;93(7):662-72. PubMed PMID: 25823994.

650. Zhang S, Takaku M, Zou L, Gu AD, Chou WC, Zhang G, et al. Reversing SKI-SMAD4-mediated suppression is essential for TH17 cell differentiation. *Nature*. 2017 Nov 2;551(7678):105-9. PubMed PMID: 29072299. Pubmed Central PMCID: PMC5743442.

651. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008 Jul 18;29(1):44-56. PubMed PMID: 18585065. Epub 2008/07/01. eng.

652. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev*. 2017 Mar;276(1):121-44. PubMed PMID: 28258700. Pubmed Central PMCID: PMC5338647.

653. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, Hichami A, et al. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity*. 2012 Mar 23;36(3):362-73. PubMed PMID: 22406269.

654. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*. 2010 Oct 21;467(7318):967-71. PubMed PMID: 20962846. Pubmed Central PMCID: PMC3108066.

655. Rivera Vargas T, Humblin E, Vegran F, Ghiringhelli F, Apetoh L. TH9 cells in anti-tumor immunity. *Semin Immunopathol*. 2017 Jan;39(1):39-46. PubMed PMID: 27832300. Pubmed Central PMCID: PMC5222918.

656. Fischer M, Bijman M, Molin D, Cormont F, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2513-6. PubMed PMID: 14562126.

657. Fang Y, Chen X, Bai Q, Qin C, Mohamud AO, Zhu Z, et al. IL-9 inhibits HTB-72 melanoma cell growth through upregulation of p21 and TRAIL. *J Surg Oncol*. 2015 Jun;111(8):969-74. PubMed PMID: 25988864.

658. Lu Y, Hong S, Li H, Park J, Hong B, Wang L, et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest*. 2012 Nov;122(11):4160-71. PubMed PMID: 23064366. Pubmed Central PMCID: PMC3484462.

659. Zhao Y, Chu X, Chen J, Wang Y, Gao S, Jiang Y, et al. Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumor immunity through the induction of Th9 cells. *Nat Commun*. 2016 Aug 5;7:12368. PubMed PMID: 27492902. Pubmed Central PMCID: PMC4980454.

660. Kim IK, Kim BS, Koh CH, Seok JW, Park JS, Shin KS, et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein co-stimulation facilitates tumor regression by inducing IL-9-producing helper T cells. *Nat Med*. 2015 Sep;21(9):1010-7. PubMed PMID: 26280119.

661. Xiao X, Shi X, Fan Y, Zhang X, Wu M, Lan P, et al. GITR subverts Foxp3(+) Tregs to boost Th9 immunity through regulation of histone acetylation. *Nat Commun.* 2015 Sep 14;6:8266. PubMed PMID: 26365427. Pubmed Central PMCID: PMC4570275.
662. Nonomura Y, Otsuka A, Nakashima C, Seidel JA, Kitoh A, Dainichi T, et al. Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology.* 2016;5(12):e1248327. PubMed PMID: 28123885. Pubmed Central PMCID: PMC5215264.
663. Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Menegaux F, et al. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut.* 2009 Apr;58(4):520-9. PubMed PMID: 19022917.
664. Dwivedi VP, Tousif S, Bhattacharya D, Prasad DV, Van Kaer L, Das J, et al. Transforming growth factor-beta protein inversely regulates in vivo differentiation of interleukin-17 (IL-17)-producing CD4+ and CD8+ T cells. *J Biol Chem.* 2012 Jan 27;287(5):2943-7. PubMed PMID: 22170065. Pubmed Central PMCID: PMC3270951.
665. Lu Y, Hong B, Li H, Zheng Y, Zhang M, Wang S, et al. Tumor-specific IL-9-producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Feb 11;111(6):2265-70. PubMed PMID: 24469818. Pubmed Central PMCID: PMC3926063.
666. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity.* 2014 Dec 18;41(6):886-97. PubMed PMID: 25526304. Pubmed Central PMCID: PMC4276131.
667. Wang ZQ, Milne K, Derocher H, Webb JR, Nelson BH, Watson PH. CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016 Jun 7. PubMed PMID: 27267849.
668. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2015 Jan 22;372(4):311-9. PubMed PMID: 25482239. Pubmed Central PMCID: PMC4348009.
669. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Oct 22;373(17):1627-39. PubMed PMID: 26412456.
670. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Jul 9;373(2):123-35. PubMed PMID: 26028407. Pubmed Central PMCID: PMC4681400.
671. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2008 Apr;8(4):299-308. PubMed PMID: 18354418. Epub 2008/03/21. eng.
672. Rosenberg SA. Raising the bar: the curative potential of human cancer immunotherapy. *Sci Transl Med.* 2012 Mar 28;4(127):127ps8. PubMed PMID: 22461638. Epub 2012/03/31. eng.
673. Yu J, Wei M, Becknell B, Trotta R, Liu S, Boyd Z, et al. Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity.* 2006 May;24(5):575-90. PubMed PMID: 16713975. Epub 2006/05/23. eng.
674. Trotta R, Col JD, Yu J, Ciarlariello D, Thomas B, Zhang X, et al. TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):3784-92. PubMed PMID: 18768831. Epub 2008/09/05. eng.
675. Casetti R, Agrati C, Wallace M, Sacchi A, Martini F, Martino A, et al. Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J Immunol.* 2009 Sep 15;183(6):3574-7. PubMed PMID: 19710458.
676. Li X, Kang N, Zhang X, Dong X, Wei W, Cui L, et al. Generation of human regulatory gammadelta T cells by TCRgammadelta stimulation in the presence of TGF-beta and their involvement

- in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2011 Jun 15;186(12):6693-700. PubMed PMID: 21562160.
677. Cortez VS, Cervantes-Barragan L, Robinette ML, Bando JK, Wang Y, Geiger TL, et al. Transforming Growth Factor-beta Signaling Guides the Differentiation of Innate Lymphoid Cells in Salivary Glands. *Immunity.* 2016 May 17;44(5):1127-39. PubMed PMID: 27156386. Pubmed Central PMCID: PMC5114145.
678. Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, Franklin RA, Luo CT, Oh SA, et al. Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell.* 2016 Jan 28;164(3):365-77. PubMed PMID: 26806130. Pubmed Central PMCID: PMC4733424.
679. Gao Y, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Bald T, Ng SS, Young A, Ngiow SF, et al. Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2017 Sep;18(9):1004-15. PubMed PMID: 28759001.
680. Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herreros A. Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle.* 2010 Jun 15;9(12):2363-74. PubMed PMID: 20519943. Epub 2010/06/04. eng.
681. Wendt MK, Allington TM, Schiemann WP. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol.* 2009 Oct;5(8):1145-68. PubMed PMID: 19852727. Epub 2009/10/27. eng.
682. Pardali E, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Front Biosci.* 2009;14:4848-61. PubMed PMID: 19482591. Epub 2009/06/02. eng.
683. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008 Jul 25;134(2):215-30. PubMed PMID: 18662538. Epub 2008/07/30. eng.
684. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006 Sep 29;313(5795):1960-4. PubMed PMID: 17008531. Epub 2006/09/30. eng.
685. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014 Jan;232(2):199-209. PubMed PMID: 24122236. Pubmed Central PMCID: PMC4255306.
686. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity.* 2018 Apr 17;48(4):812-30 e14. PubMed PMID: 29628290.
687. Spranger S, Sivan A, Corrales L, Gajewski TF. Tumor and Host Factors Controlling Antitumor Immunity and Efficacy of Cancer Immunotherapy. *Adv Immunol.* 2016;130:75-93. PubMed PMID: 26923000. Pubmed Central PMCID: PMC4864964.
688. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350-6. PubMed PMID: 26457759. Pubmed Central PMCID: PMC4636487.
689. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Cespedes MV, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell.* 2012 Nov 13;22(5):571-84. PubMed PMID: 23153532. Pubmed Central PMCID: PMC3512565.
690. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llergo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, Iglesias M, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015 Apr;47(4):320-9. PubMed PMID: 25706628.
691. Wei Y, Kim TJ, Peng DH, Duan D, Gibbons DL, Yamauchi M, et al. Fibroblast-specific inhibition of TGF-beta1 signaling attenuates lung and tumor fibrosis. *J Clin Invest.* 2017 Oct 2;127(10):3675-88. PubMed PMID: 28872461. Pubmed Central PMCID: PMC5617667.
692. Principe DR, DeCant B, Mascarinas E, Wayne EA, Diaz AM, Akagi N, et al. TGFbeta Signaling in the Pancreatic Tumor Microenvironment Promotes Fibrosis and Immune Evasion to Facilitate

Tumorigenesis. *Cancer Res.* 2016 May 1;76(9):2525-39. PubMed PMID: 26980767. Pubmed Central PMCID: PMC4873388.

693. Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, et al. TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature.* 2018 Feb 22;554(7693):544-8. PubMed PMID: 29443960.

694. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, et al. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science.* 2004 Feb 6;303(5659):848-51. PubMed PMID: 14764882. Epub 2004/02/07. eng.

695. Donkor MK, Sarkar A, Li MO. Tgf-beta1 produced by activated CD4(+) T Cells Antagonizes T Cell Surveillance of Tumor Development. *Oncoimmunology.* 2012 Mar 1;1(2):162-71. PubMed PMID: 22720237. Pubmed Central PMCID: PMC3376999.

696. Park BV, Freeman ZT, Ghasemzadeh A, Chattergoon MA, Rutebemberwa A, Steigner J, et al. TGFbeta1-Mediated SMAD3 Enhances PD-1 Expression on Antigen-Specific T Cells in Cancer. *Cancer Discov.* 2016 Dec;6(12):1366-81. PubMed PMID: 27683557. Pubmed Central PMCID: PMC5295786.

697. Stephen TL, Payne KK, Chaurio RA, Allegranza MJ, Zhu H, Perez-Sanz J, et al. SATB1 Expression Governs Epigenetic Repression of PD-1 in Tumor-Reactive T Cells. *Immunity.* 2017 Jan 17;46(1):51-64. PubMed PMID: 28099864. Pubmed Central PMCID: PMC5336605.

698. Vanpouille-Box C, Diamond JM, Pilonis KA, Zavadij J, Babb JS, Formenti SC, et al. TGFbeta Is a Master Regulator of Radiation Therapy-Induced Antitumor Immunity. *Cancer Res.* 2015 Jun 1;75(11):2232-42. PubMed PMID: 25858148. Pubmed Central PMCID: PMC4522159.

699. Courau T, Nehar-Belaid D, Florez L, Levacher B, Vazquez T, Brimaud F, et al. TGF-beta and VEGF cooperatively control the immunotolerant tumor environment and the efficacy of cancer immunotherapies. *JCI Insight.* 2016 Jun 16;1(9):e85974. PubMed PMID: 27699271. Pubmed Central PMCID: PMC5033816.

700. Xu Z, Wang Y, Zhang L, Huang L. Nanoparticle-delivered transforming growth factor-beta siRNA enhances vaccination against advanced melanoma by modifying tumor microenvironment. *ACS Nano.* 2014 Apr 22;8(4):3636-45. PubMed PMID: 24580381. Pubmed Central PMCID: 4004320.

701. Rooney CM, Leen AM, Vera JF, Heslop HE. T lymphocytes targeting native receptors. *Immunol Rev.* 2014 Jan;257(1):39-55. PubMed PMID: 24329788. Pubmed Central PMCID: 3869095.

702. Riviere I, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptors: A Cell and Gene Therapy Perspective. *Mol Ther.* 2017 May 03;25(5):1117-24. PubMed PMID: 28456379. Pubmed Central PMCID: PMC5417838.

703. Barrett DM, Singh N, Porter DL, Grupp SA, June CH. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annu Rev Med.* 2014;65:333-47. PubMed PMID: 24274181. Pubmed Central PMCID: 4120077.

704. Kloss CC, Lee J, Zhang A, Chen F, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. Dominant-Negative TGF-beta Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication. *Mol Ther.* 2018 May 8. PubMed PMID: 29807781.

705. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015 Jul 2;373(1):23-34. PubMed PMID: 26027431.

706. Nizard M, Roussel H, Diniz MO, Karaki S, Tran T, Voron T, et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nat Commun.* 2017 May 24;8:15221. PubMed PMID: 28537262. Pubmed Central PMCID: PMC5458068.

**Annexe1: TGF- β in T cell biology: implications for
cancer immunotherapy**

TGF- β in T cell biology: implications for cancer immunotherapy

Amina Dahmani¹, Jean-Sébastien Delisle^{1,2}

1 Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 Boul. de L'Assomption, Montréal, Qc, H1T 2M4, Canada. 2Hematology-Oncology service, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Department of medicine, Université de Montréal;

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Transforming Growth Factor beta (TGF- β) is a pleiotropic cytokine produced in large amounts within cancer microenvironments that will ultimately promote neoplastic progression, notably by suppressing the host's T-cell immunosurveillance. This effect is mostly due to the well-known inhibitory effect of TGF- β on T cell proliferation, activation and effector functions. Moreover, TGF- β subverts T cell immunity by favoring regulatory T-cell differentiation, further reinforcing immunosuppression within tumor microenvironments. These findings stimulated the development of many strategies to block TGF- β or its signaling pathways, either as monotherapy or in combination with other therapies, to restore anti-cancer immunity. Paradoxically, recent studies provided evidence that TGF- β can also promote differentiation of certain inflammatory populations of T cells, such as Th17, Th9 and resident-memory T cells (Trm), that have been associated with improved tumor control in several models. Here, we review current advances in our understanding of the many roles of TGF- β in T cell biology in the context of tumor immunity and discuss the possibility to manipulate TGF- β signaling to improve cancer immunotherapy.

Keywords: TGF- β , T cells, cancer, immunotherapy

Introduction

Transforming growth factor beta (TGF- β) is a major determinant of hematopoietic and immune cell development and physiology. The objective of this review is to provide an overview of TGF- β biology in conventional T cells, specifically in relation to cancer biology and immunotherapy. TGF- β is an evolutionally conserved cytokine that belongs to a large family of morphogens and growth factors(591). In mammals, TGF- β is widely expressed and modulates a large spectrum of biological processes including normal development, carcinogenesis and immune responses. This great versatility and pleiotropy requires the input from a multitude of other pathways (reviewed in (592-599)). The roles of TGF- β in T cells and cancer immunology remain likewise highly context-dependent.

The development and progression of cancer are also markedly impacted by the effects of TGF- β (600). Along with numerous effects on the neoplastic cells and tumor stroma, the multipronged effects of TGF- β on immune cells shape the cancer microenvironment(477). In cancer, TGF- β has been shown to support the evasion of cancer cells from immune surveillance and to contribute to the subversion of the immune system from being an extrinsic tumor suppressor, to a promoter of malignant growth and spread(6, 354, 425, 601, 602). Hence, in addition to the strong rationale to use TGF- β antagonist therapy to directly target cancer cells and tumor stroma, the prospect of reinvigorating anti-tumor immunity with TGF- β inhibition is appealing, especially in an emerging era of cancer immunotherapy(603). However, TGF- β is more than an immunosuppressive cytokine and can also promote the differentiation, the function and homeostasis of certain inflammatory populations of T cells, such as T-helper 17 (Th17), Th9 and resident memory T cells (Trm)(355). It is

46 to be anticipated that the current and future therapies that will most efficiently target TGF- β in
47 cancer will benefit from the knowledge accumulated over more than two decades on the role of
48 TGF- β in T-cell biology. In mammals, three TGF- β isoforms have been identified: TGF- β 1, TGF- β 2
49 and TGF- β 3. In the immune system, TGF- β 1 isoform is predominant and controls the development,
50 the homeostasis, the differentiation and function of multiple immune cell types(355, 604). The
51 central role of TGF- β as a regulator of the immune system was revealed by TGF- β 1-deficient mice
52 that develop a severe multifocal and fatal inflammatory response, associated with disruption of
53 different immune cell compartments including T cells, B cells, macrophages and dendritic cells(357-
54 360). This lethal inflammatory disorder was also observed in mice with T cell-specific
55 overexpression of a dominant-negative TGF β R2 (dnTGF β R2)(366), or deletion of either TGF β R1 or
56 TGF β R2(370, 605, 606) and attenuated in T-cell deficient mice(367). Importantly, these studies
57 confirmed that the essential role of TGF- β in self-tolerance hinged on T cells, and that multiple
58 mechanisms were at play. Notably, conventional T cells underwent uncontrolled proliferation,
59 activation and effector differentiation while regulatory T cells (Tregs), that are essential for
60 peripheral tolerance(368) , were reduced. These studies established TGF- β as both a modulator of T-
61 cell physiology and differentiation.

TGF- β secretion, activation and signaling

TGF- β is synthesized by several cell types, including most hematopoietic cell subtypes as an inactive molecule, composed of a homodimer of mature TGF- β non-covalently associated with the latency-associated protein (LAP). This small latent complex is either secreted or associated with another protein, latent-TGF- β -binding protein (LTBP), that directs TGF- β to the extracellular matrix for future activation(344, 604). To mediate its biological functions, mature TGF- β must be released from LAP. This action can be achieved through several mechanisms including dissociation by acidic pH, interaction with integrins or proteolysis of LAP by matrix metalloproteinases. In physiological conditions, integrins play a crucial role in the activation of TGF- β in the immune system. Specifically, the integrins $\alpha\beta6$ and $\alpha\beta8$ are essential to the regulation of immune homeostasis, as mice lacking both functional $\alpha\beta6$ and $\alpha\beta8$ integrins reproduced the phenotype seen in TGF- $\beta1^{-/-}$ mice(607). Conditional deletion of integrin $\alpha\beta8$ on leukocytes causes severe inflammatory bowel disease and age-related autoimmunity in mice, suggesting a key role of $\alpha\beta8$ integrin-mediated TGF- β activation by leukocytes in maintaining T-cell homeostasis and controlling inflammation(608). This autoimmune phenotype was largely due to lack of $\alpha\beta8$ on dendritic cells, as mice lacking $\alpha\beta8$ principally on dendritic cells develop similar phenotype as mice lacking $\alpha\beta8$ on all leukocytes. In contrast, mice lacking $\alpha\beta8$ on T cells alone are phenotypically normal(608). These results were further reinforced by the finding that a specific loss of integrin $\alpha\beta8$ in a specialized subset of CD103⁺dendritic cells in the intestine, abrogated their ability to induce Tregs(609). Moreover, it has been shown that integrin $\alpha\beta8$ expression on dendritic cells plays a critical role in the differentiation of Th17 cells. Mice lacking integrin $\alpha\beta8$ in dendritic cells have reduced numbers of Th17 cells in the colonic mucosa and fail to generate highly pathogenic Th17 cells during experimental autoimmune encephalomyelitis(610). In addition to dendritic cells, Tregs can capture latent TGF- β at their surface and activate it. This capture involves latent TGF- β binding to a transmembrane protein called glycoprotein A repetitions predominant, GARP(611-614). Moreover, the gene encoding $\beta8$ subunit of the integrin $\alpha\beta8$ has been shown to be selectively expressed in both mouse and human Tregs, but not conventional T cells(615, 616). These studies showed that mouse Tregs require integrin $\alpha\beta8$ to activate TGF- $\beta1$ and that $\alpha\beta8$ -deficient Tregs are unable to induce differentiation of naive T cells into IL-17 expressing Th cells (Th17) *in vitro*. Finally, $\alpha\beta8$ integrin is constitutively expressed on thymic Treg and mediates the release of active TGF- $\beta1$ from the latent TGF- $\beta1$ /GARP complex.

Once released, active TGF- β binds to dimeric TGF β type 2 receptor (TGF β RII), a serine/threonine kinase, that recruits and activates a second dimeric type 1 receptor (TGF β RI) to form a tetrameric receptor complex that initiates signaling pathways through its kinase activity. Activated TGF β RI phosphorylates the mothers against decapentaplegic homolog (SMAD) 2 and SMAD3 which are transcription factors that subsequently form a complex with SMAD4 or the transcriptional intermediary factor 1 gamma (TIF1 γ)(349, 350). This complex translocates into the nucleus where it recruits transcription cofactors to modulate the expression of target genes. In addition, activated TGF- β receptor complexes can also trigger SMAD-independent, non-canonical pathways, such as several mitogen-activating protein kinases (MAPKs) pathways, Rho-like GTPase signaling pathways and phosphatidylinositol- 3-kinase/AKT pathways, to regulate a wide array of function in different cellular and tissues contexts(598). This multiplicity of signaling pathways and the inherent plasticity of SMAD signaling downstream of TGF- β receptors mediated notably by the recruitment of co-factors and post-translational modifications, as well as the diverse mechanisms that control the bioavailability of TGF- β , contribute to the pleiotropic nature of TGF- β actions(349, 591, 599).

TGF- β : suppressor of T-cell proliferation and effector functions

TGF- β is implicated in the regulation of diverse immune responses ranging from infections, suppression of autoimmune disorders and cancer through direct regulatory effects on multiple immune cell types, including lymphocytes, dendritic cells and numerous myeloid subsets(354, 355). In TGF- β 1-deficient and in conditional T-cell specific TGF β R-deficient mice, T cells showed increased proliferation, activation and T-helper 1 (Th1) as well as Th2 cytokine production(364, 382). Although invaluable, these mouse models did not allow to fully dissect the role of TGF- β at different stage of development. The deletion of TGF β R2 in mature T cells does not result in autoimmunity. Rather, it predisposes T cells to enhanced reactivity and expansion following stimulation or homeostatic expansion(617). Likewise, the methods to abrogate TGF- β signaling (complete knock-out versus dominant negative receptor expression) can result in different outcomes, suggesting a dose-effect in TGF- β signaling(618). In addition, abrogation of canonical TGF- β signaling intermediates such as the SMADs do not recapitulate the severe autoimmune features observed in TGF β R-deficient mice, implying a role for non-canonical TGF- β signaling pathways in the control of inflammation(619, 620). These relevant distinctions notwithstanding, common features are that TGF- β inhibits conventional T-cell proliferation and effector functions.

T-cell proliferation. It has been shown in several cell types that TGF- β is a potent inhibitor of cellular proliferation. In hematopoietic stem cells, TGF- β regulates quiescence through several mechanisms including modulation of mechanistic target of rapamycin (mTOR) Forkhead box O3 (FOXO3)(440) (621). In turn, TGF- β signaling in stem cells was recently found to be dependent on Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) which positively regulate TGF- β signaling (622). In T cells, the main drivers of proliferation are cytokines and signals downstream of the T-cell receptor (TCR) and co-stimulatory molecules. *In vitro*, exogenous TGF- β suppresses IL-2-dependent proliferation of activated human T cells and partially inhibits IL-2 receptor expression(356). This effect could only be partially reversed by the addition of exogenous IL-2, suggesting that the cytostatic effect of TGF- β on T cells is not only due to the suppression of IL-2 production. TGF- β was shown to inhibit IL-2 production through direct inhibition of IL-2 promoter activity in a SMAD3-dependant manner(373, 374). *In vivo*, T cell-specific expression of a dnTGF β R2 expression has demonstrated that TGF- β negatively regulates CD4 and CD8 T cell expansion(364, 366). TGF- β can also inhibit T cell proliferation through the transcriptional regulation of cell cycle target genes, including cyclin-dependent kinases inhibitors (p15, p21 and p27), and c-myc(376, 377). The mechanisms by which TGF- β interacts with these genes are still unclear, but the canonical TGF- β mediator SMAD3 has been shown to be a key mediator of the growth inhibitory effect of TGF- β in T cells(623). T cells from SMAD3-null mice are resistant to the antiproliferative effect of TGF- β (361, 624, 625). However, the anti-proliferative effects of SMAD3 may be more prominent in CD4⁺ than in CD8⁺ T cells(528), suggesting the possible implication of SMAD2-dependent or SMAD-independent pathways to limit CD8⁺ T-cell proliferation(474, 618). Another study suggests that the TGF- β /SMAD3 pathway restricts CD4⁺ T-cell growth and proliferation by mitigating the effects of CD28 costimulation resulting in decreased mTOR signaling(375). Likewise, TGF- β was also shown to negatively regulate NK cell functions by inhibiting mTOR signaling(626).

T-cell activation. In addition, TGF- β impedes T cell activation by interfering with proximal TCR signaling events such as phosphorylation and activation of the Tec kinase I κ k, Ca²⁺ mobilization,

NFATc translocation, and activation of the mitogen-activated protein kinase ERK Tec kinase, that are critical for T cell differentiation(378, 379). TGF- β also abrogates TCR-mediated signaling by upregulating tyrosine phosphatases such as SHP-1, which in turn negatively regulate molecules downstream of the TCR such as the protein tyrosine kinases (PTK) P56lck, P59fyn, and Zap-70(380). Of particular relevance to this report, T lymphocytes deficient for Diacylglycerol kinases DGK- ζ (known to play a role in TCR signal transduction by initiating degradation of the second messenger DAG) and engineered to express a cancer targeting chimeric antigen receptor (CAR) were less sensitive to TGF- β mediated suppression than their wild type counterparts(627). The mechanistic underpinnings of such effect are unclear, but it was previously shown that mediators downstream of TCR signaling can actively suppress TGF- β signaling, thereby allowing T cells to escape TGF- β regulation during activation(628). The interplay between TCR signaling and TGF- β involves several feedback loops with the suppressive effects of TGF- β being most important at the initiation of the response but not in post-activation, actively proliferating T cells(629).

T-cell effector functions. TGF- β has also been shown to be a potent suppressor of CD8⁺ cytotoxic T cell (CTL) effector functions through diverse mechanisms, including inhibition of perforin, Granzyme B and A, interferon-gamma (IFN- γ) and FAS ligand (FASL) expression (Figure 1). Thomas and Massagué showed that systemic neutralization of TGF- β *in vivo* results in tumour eradication, associated with an increase in CD8⁺ T-cell mediated tumour-cell-specific cytotoxicity(381). Moreover, the genes encoding for the effectors molecules of CTL response, as well as their intracellular concentration, were downregulated in T cells activated *in vitro* in the presence of TGF β . Indeed, TGF- β neutralization *in vivo* permitted to recover the expression of these molecules. Consistent with this, many other studies showed that the adoptive transfer of tumor specific CTL engineered to be desensitized to TGF- β displayed enhanced CTL function and antitumor responses(478, 630-632). Central to the inhibition of cell cytotoxic mechanism by TGF- β is the regulation of T-cell activation associated transcription factors expression. Notably, the master regulators of CTL differentiation and activation T-BET, EOMES, and BLIMP-1 are directly targeted by TGF- β . The transcription factors T-BET and EOMES promote the expression of type 1 cytotoxic molecules (e.g., granzyme B, perforin, and IFN- γ)(240, 518, 633-635). In the B16 melanoma murine model, *in vivo* administration of ALK5 inhibitors (which block phosphorylation of receptor SMADs by occupying the ATP binding site of T β RI domain) suppressed tumor progression and enhanced CTL responses through the restoration of EOMES expression(383). Likewise, TGF- β inhibits T-BET expression in Th1 cells and has been shown to inhibit the acquisition of effector functions in *ex vivo* stimulated memory human CD8⁺ T cells reactive melanoma antigens(382, 530). The transcriptional repressor BLIMP-1 also promotes CTL effector differentiation and actively suppress T-cell memory transcriptional program(505, 636). In mouse models of established tumors, Lin and al. showed that tumor-derived TGF- β directly suppresses CTL function by inhibiting BLIMP-1 expression through the stimulation of miR-23a expression(313). The abrogation of miR-23a expression ameliorated TGF- β -induced CTL suppression and restored Granzyme B and IFN- γ expression, thereby mitigating TGF- β -induced immunosuppression. The inhibition of T-cell activation, proliferation and cytotoxicity is intricately linked to T-cell differentiation mechanisms where TGF- β intervenes at several levels to influence T-cell fates as described in the next section.

Figure 1

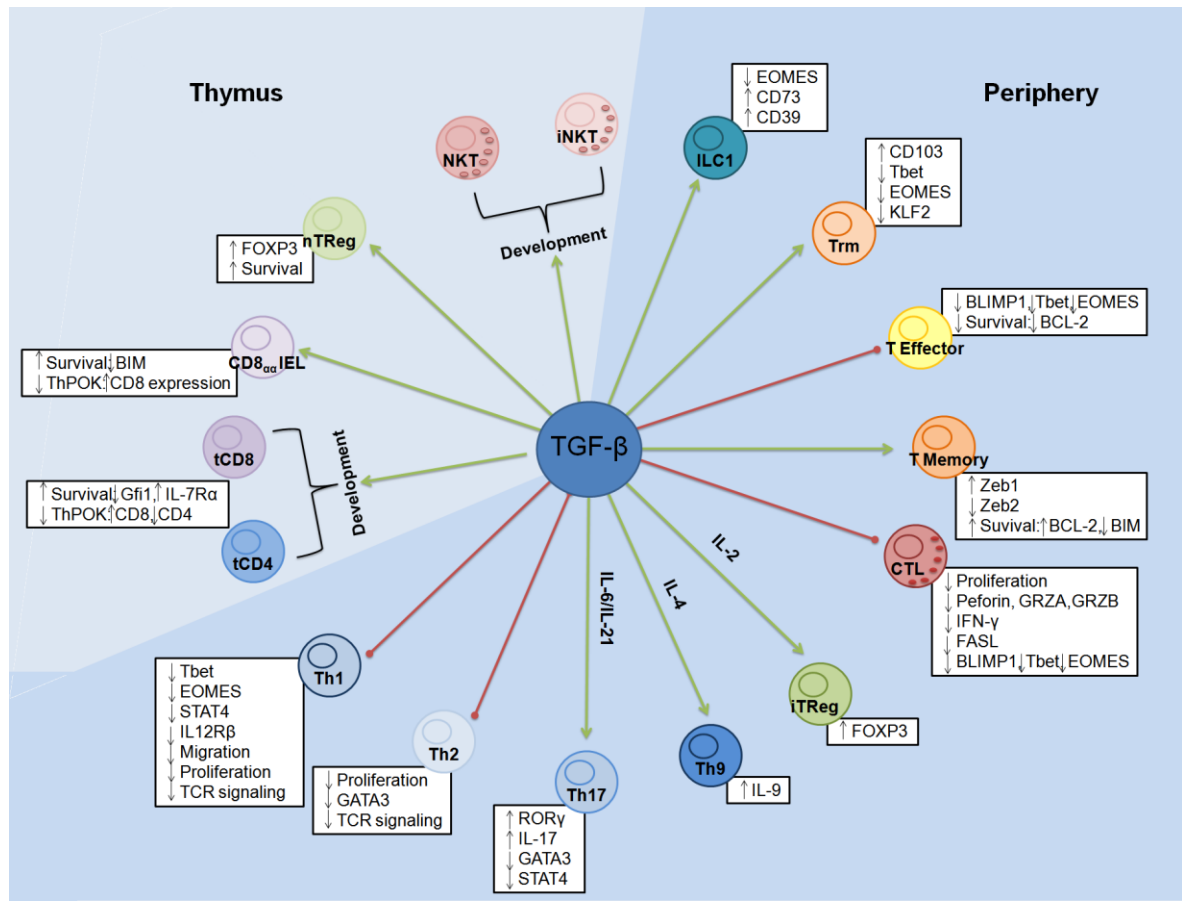


Figure 1: Overview of TGF-β effects on T-cell subsets. Graphical representation of positive (green) or inhibitory (red) effects of TGF-β signaling on T-cell differentiation across developing T cells (in the thymus, light blue) or mature T-cell subsets (in the periphery, dark blue). Mechanistic or physiologic impact of TGF-β signaling on the various T-cell subsets indicated in the white boxes).

TGF-β: master regulator of T-cell homeostasis and differentiation

T-cell development and homeostasis. From T-cell ontogeny to the regulation of T-cell survival and death, TGF-β modulates several aspects of T-cell fate decisions (recently reviewed in(355)) that are directly relevant to cancer immunobiology and immunotherapy (Figure 1). During T-cell development in the thymus, TGF-β acts as a pro-survival factor for developing conventional CD4⁺ and CD8⁺ T cells selected for low avidity against self-antigens through a positive effect on IL-7 receptor-alpha (IL-7Rα) expression(369). Moreover, TGF-β not only promotes CD4⁺ and CD8⁺ T-cell survival but also the ontogeny of thymic regulatory (tTregs) and several subsets of innate T cells (invariant natural killer T cells-iNKT and CD8αα⁺TCRαβ⁺ intra-epithelial lymphocytes-IEL). In this setting, TGF-β may attenuate negative selection following strong interactions between the developing precursors and their antigenic ligand(371).

Post-thymic mature naïve CD4⁺ T cells continue to receive pro-survival signals from TGF-β in the periphery, which contributes to maintain a diverse T-cell repertoire(372). The role of TGF-β in CD8⁺ T-cell homeostasis is more complex and highlights the pleiotropy of this cytokine. Importantly, it reemphasizes the importance of T-cell differentiation status on the outcome of TGF-β signaling. Indeed, several models have shown that TGF-β prevents T-cell activation and expansion(366, 617),

promotes survival of post-activation and memory T cells(385, 399, 400), but favors apoptosis of effector T cells (454). Although most mechanisms that underlie these divergent influences are still unknown, it was recently shown that TGF- β upregulates *Zeb1* and inhibits *Zeb2* which are transcription factors that respectively promote memory T-cell survival and favor terminal effector T-cell differentiation in murine lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection(243). Interestingly, TGF- β modulation of *Zeb* transcription factors is a cardinal feature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) which is at the origin of the metastatic behavior of cancer cells(637-639). In the case of CD8⁺ T cells, conditional deletion of *Zeb1* led to low expression of the anti-apoptotic BCL-2 molecule relative to the pro-apoptotic molecule BIM in memory T cells. This is in contrast with the finding that low BCL-2 expression was proposed as a mechanism to explain the pro-apoptotic role of TGF- β in effector CD8⁺ T cells(454). It is therefore likely that depending on different cellular contexts, TGF- β modulates opposing cellular fates through divergent modulation of the same pathways.

CD4⁺ T-cell differentiation. In order to mount effective immune responses, T cells must differentiate into specialized subtypes. Best described for CD4⁺ helper T cells(640), T-cell differentiation is heavily influenced by TGF- β (Figure 1). Consistent with a predominantly immunoregulatory role and of particular relevance to T-cell responses against cancer, TGF- β has been shown to significantly blunt Th1 and Th2 effector differentiation (366, 382, 386, 387). The CD4⁺ Th1 response, which overlaps with CTL differentiation in CD8⁺ T cells, is notably characterized by IFN- γ production and responses against virus-infected cells and cancers. Th1 responses are significantly inhibited by TGF- β which suppresses the expression of the Th1 fate determining transcription factors T-BET, EOMES and STAT4(382, 385, 386, 605). In addition, TGF- β favors Treg differentiation from uncommitted peripheral CD4⁺ T cells through the induction of the Treg signature transcription factor FOXP3(370, 398, 497, 641, 642). Both thymus-derived and induced Tregs will suppress immune responses through several mechanisms, including the production and activation of TGF- β (643). Along with the suppression of T-cell activation and cytotoxicity, the mitigation of Th1 responses and the induction of Treg differentiation are central to the immunoregulatory role of TGF- β in tumors(354). The production of TGF- β by the tumor cells, immature dendritic cells and stromal element favor the recruitment and in situ conversion of effector T cells into Tregs at least in part through the direct action of SMAD3 on the FOXP3 gene promoter(398, 644-647).

Despite undisputable immunoregulatory effects, TGF- β also controls T-cell differentiation programs leading to inflammatory subset generation. Among TGF- β -dependent subsets, Th9, Th17 and CD8⁺ resident memory (Trm) T cells are of particular relevance to cancer (Figure 1). Whether Th17 contribute to pro- or anti-tumor inflammation remains controversial and context dependent (reviewed in(648)). Importantly, TGF- β is one of the factors that may explain the dual effects of Th17 T cells in cancer. The role of TGF- β in Th17 fate determination is both direct and indirect. Along with IL-6, IL-1 β , IL-23 and IL-21, TGF- β directly support the expression of the Th17 lineage determining transcription factor ROR γ t in mouse CD4⁺ T cells (RORC in humans)(391). Moreover, the inhibition of other differentiation programs (namely Th1 and Th2) through TGF- β favors Th17 generation(392-394). However, beyond the signals that initially trigger the Th17 program, several other cytokines can further specialize Th17 cells, or reverse their phenotype and function. Importantly, TGF- β itself alters the Th17 fate at several stages. In addition to the cytokine context that will favor Th17 instead of Treg differentiation, a determining and often underappreciated variable is the concentration of TGF- β . At high concentration, TGF- β favors Treg over Th17 differentiation through inhibition of IL-23R expression and direct antagonism of FOXP3 on ROR γ c expression(395). In addition, the multiplicity of signaling pathways downstream of TGF- β receptors can also contribute to lineage determination. The TGF- β canonical mediator SMAD4 articulates Treg but not Th17 differentiation, which was shown to

rely on non-canonical AKT and MAPK signaling(620, 649-651). Moreover, within the context of tumors, ongoing TGF- β signaling could boost several immunoregulatory properties of Th17 cells. Among them, the suppression of T-BET and the expression of the ectonucleotidases CD73 and CD39 leading to adenosine production and suppression of immune responses(652, 653). Moreover, in pre-clinical models, a subset of Th17 induced by TGF- β and IL-6 and expressing high levels of aryl hydrocarbon receptor (AhR), was found to secrete IL-10 and have immunoregulatory properties (Treg17) (396, 397). These data infer that the optimal mobilization of Th17 for cancer therapy may require the generation of highly inflammatory Th17 without TGF- β , or the neutralization of high TGF- β concentration found in tumors(654).

The Th9 fate is characterized by the secretion of IL-9 by CD4⁺ T cells, leading to several pro-inflammatory and anti-cancer effects (reviewed in(655)). Th9 cells, close relative of Th2 T cells, are generated following TGF- β and IL-4 signaling leading to expression of the transcription factor PU.1 and IL-9 production. While controversy persists on whether a Th9 response is beneficial or harmful in human cancer(656), Th9 T cells have several properties that make them appealing as an anti-cancer subset. Th9 and IL-9 were shown to have direct pro-apoptotic effects on cancer cells(657) and pro-survival effects on T cells. Other effects include mast cell stimulation, IFN- γ production by T cells and NK cells and their recruitment along with dendritic cells and other leukocytes(658, 659). Intriguingly, it was also shown in pre-clinical models that the anticancer effects following agonistic stimulation of glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) expressed on T cells was through the development of a Th9 response(660, 661). Whether Th9 immunity develops under treatment with other T-cell co-stimulation modulators such as immune checkpoint blockade in humans is being investigated and should provide important prognostic and mechanistic insights (662).

CD8⁺ T-cell differentiation. Although most extensively described for CD4⁺ T cells, the effects of TGF- β on T-cell differentiation schemes extend to CD8⁺ T cells. The induction of FOXP3 in CD8⁺ T cells through TGF- β can lead to the differentiation CD8⁺ Tregs with suppressive functions in inflammatory disease and human cancer(663). Likewise, IL-17-producing CD8⁺ T cells (Tc17) have been described in numerous settings, but the contribution of TGF- β to Tc17 skewing may not be as important as for Th17 differentiation given that the differentiation of Tc17 is not impaired in transgenic mice expressing a dnTGF β R2(664). Interestingly, the injection of CD8⁺ cultured in Th9 skewing conditions (IL-4, TGF- β and anti-IFN γ) was shown to give rise to Tc9 with stronger anti-tumor effects than IFN- γ cytolytic CD8⁺ T cells in a pre-clinical models of melanoma and lung cancer(665). Hence, the modulation of Treg, Th17 and Th9 fates in cancer is likely to have important impact on the entire conventional T-cell compartment.

A CD8⁺ T-cell subset with strong relevance to cancer is a group of T cells designated as resident-memory T cells (Trm). These long-lived T cells infiltrate tissues and are retained peripherally to mediate rapid responses to invading pathogens(666). These T cells are diverse and vary according to their tissue of residence. TGF- β potently induces CD103, an integrin favoring direct contact with epithelia, and downregulates *KLF2*, a transcription factor favoring egress from secondary lymphoid organ, migration in the periphery and retention in tissues through sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) downregulation(251, 253). In addition, Trm differentiation has been shown to rely on T-BET and EOMES downregulation which, is mediated by TGF- β (254), as in the inhibition of Th1 differentiation. In several cancers, the presence of CD8⁺CD103⁺ infiltrating T cells within tumor microenvironment correlates with improved survival(228-230, 667). This raises the possibility that the most effective tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) that are stimulated through immune checkpoint blockade(668-670) or harvested and re-infused as cell therapy(671, 672) are partly attracted and retained within tumor environments through TGF- β -dependent mechanisms(228). As described below, the role of

TGF- β signaling in shaping the immune environment of cancer is far more complex, but enhancing tumor-residence of T cells may represent a promising approach to enhance current immunotherapies.

Innate T-cell differentiation. Finally, the role of innate lymphoid cell (ILC), innate-like T cells (ILTC), natural killer (NK) cells and $\gamma\delta$ T cells, is increasingly studied in the context of cancer immunobiology. It has been known for a long time that TGF- β potently inhibits NK cell functions(401, 403, 673, 674) and that it can induce $\gamma\delta$ Tregs(675, 676). More recently, TGF- β has emerged as a key factor determining the differentiation and characteristics of tissue resident group 1 ILC (ILC1)(677). Such unconventional T cells are cytotoxic and secrete IFN- γ thereby mediating early responses against neoplastic cells in experimental models(678). Whether TGF- β modulates these responses by resident innate cells is currently unknown. However, the differentiation of group 1 ILC (ILC1) from innate NKp46⁺ lymphoid precursors in mouse salivary glands has been shown by Cortez and colleagues to depend on the TGF- β -mediated suppression of the transcription factor EOMES through Jun N-terminal kinase-dependent signaling(677). Importantly, TGF- β imprinted phenotypic and functional features in salivary glands ILC1 that were not present in ILC1 from different organs. Several immunoregulatory characteristics such as low IFN- γ secretion and the expression of CD39 and CD73 were induced in a TGF- β -dependent manner specifically in the salivary gland ILC1 cells. Moreover, TGF- β has been found to differentiate NK cells into ILC1 within cancer microenvironment. This resulted in decreased anti-tumor effects and escape from NK-mediated tumor control (679). Hence, the impact of TGF- β on ILC1 differentiation and characteristics is highly context dependent and remains to be fully defined in cancer.

Globally, the extensive work done on the roles of TGF- β in T-cell differentiation reveal that the impact of TGF- β depends on context (i.e. other signals and cellular states), timing of exposure and concentration. Hence, the outcome of TGF- β signaling modulation in cancer therapy is likely to depend on these important variables.

TGF- β : architect of the immune tumor microenvironment and therapeutic opportunities

The presence of TGF- β in cancer microenvironments impacts several biological processes that ultimately contribute to cancer progression. The importance of TGF- β signaling on cancer cells, or cancer cell resistance to TGF- β signaling during cancer progression, as well as the impact of TGF- β in non-immune and non T-cell subsets that compose the neoplastic microenvironment have been reviewed elsewhere and will not be extensively discussed here (354, 449, 477, 600, 602, 680-683). It should nonetheless be mentioned that TGF- β from several sources can have a determining impact on T cells within the cancer microenvironment. This section will focus on TGF- β signaling as a direct and indirect modifier of conventional T-cell function in the cancer microenvironment (depicted in Figure 2) and how TGF- β signal modulation can be used therapeutically.

Figure 2

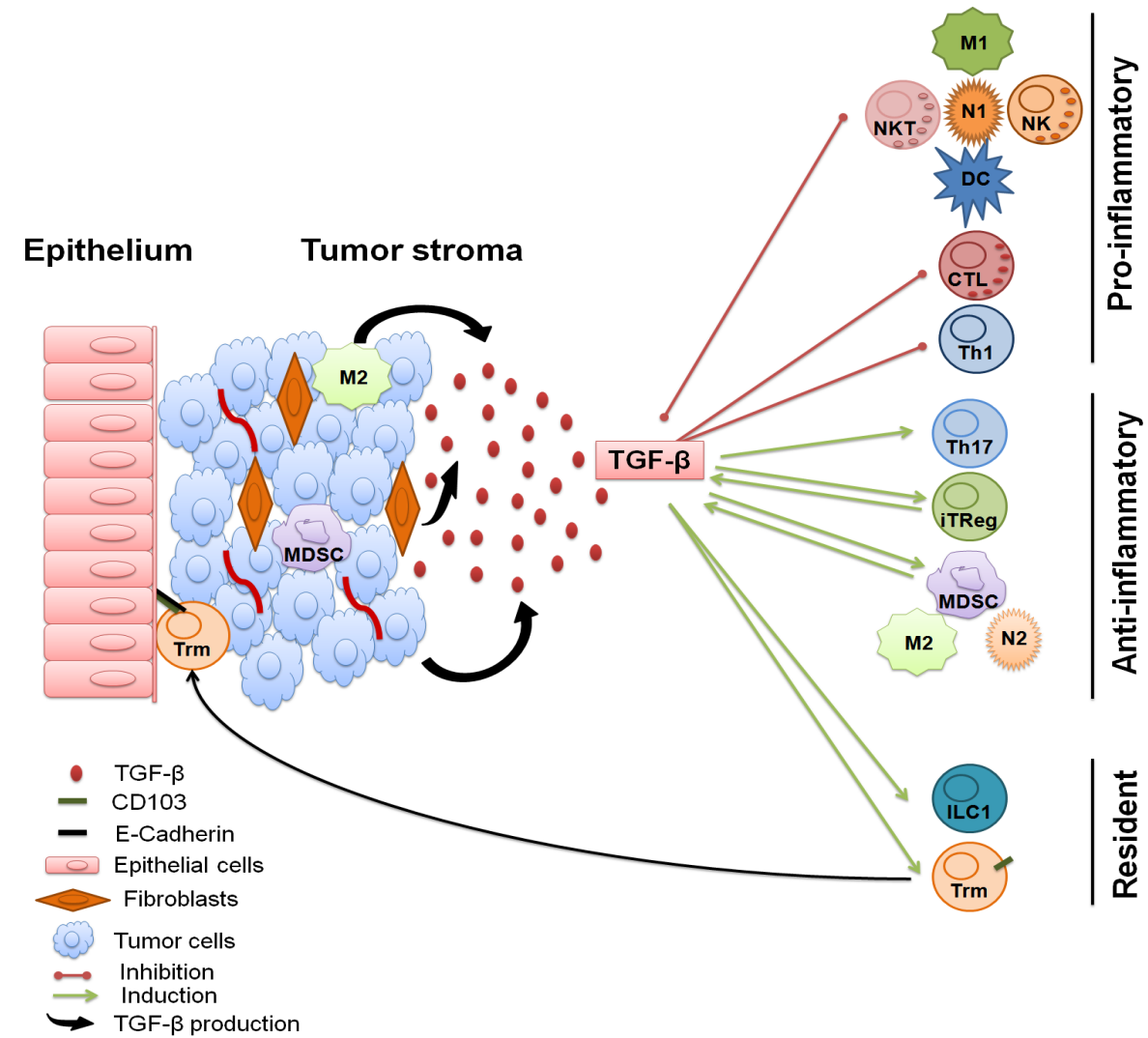


Figure 2. Schematic representation of TGF- β as a modulator of the tumor microenvironment. Representation of inflammatory lymphoid and myeloid (DC-dendritic cells, M1 inflammatory macrophages or neutrophils – N1) immune cells negatively regulated (red) by TGF- β , and anti-inflammatory subsets promoted (green) by the actions of TGF- β (including myeloid-derived suppressor cells-MDSC, anti-inflammatory macrophages – M2 or neutrophils – N2). The action of TGF- β in the migration and retention of T cells is exemplified by the effect on Trm differentiation and can result in both tumor infiltrating lymphocyte (TIL) generation or lead to exclusion from tumors when TGF- β is produced by surrounding stromal cells.

TGF- β , T cells and the tumor microenvironment. The immune cell composition and context of human cancers has important biologic and clinical implications(684-687). Globally, the presence of abundant TGF- β in cancer microenvironments adversely impact cancer prognosis. Importantly, this is secondary to several TGF- β -dependent processes, such as angiogenesis, fibrosis and EMT that extend beyond immunosuppression (reviewed in(424)). Perhaps best described for colo-rectal cancer, the co-

occurrence of high TGF- β activity and EMT features correlates with poor outcome and metastatic spread(688). The production of TGF- β by stromal cells appears to be particularly relevant to the development of such phenotypes(689, 690). The relevance of TGF- β signaling in cancer-associated fibroblasts was also proposed to regulate tumor fibrosis and immunity in pancreatic and lung cancer(691, 692). It was also recently shown that TGF- β activated stroma leads to T-cell exclusion from tumor cells (further discussed below) (434, 693).Recent immunogenomic data collected from more than 10,000 human tumors has identified six immune cancer clusters based on several features including TGF- β gene signatures. TGF- β characterized several categories, with the notable exception of “immunologically quiet” cancers defined by poor T-cell infiltration (686). Thus, one may speculate that TGF- β is central to the interplay between cancer cells, the stroma and T cells. The sources of TGF- β within cancer microenvironment are varied. The high concentration of TGF- β in tumor microenvironments attracts and converts fibroblastic, myeloid and lymphoid cells into immunosuppressive, TGF- β producing cells(424, 477, 694). Hence, tumor cells, infiltrating myeloid cells, fibroblasts and Tregs secrete TGF- β in several neoplastic conditions but conventional T cells likely contribute themselves to the TGF- β -rich milieu found in most cancers (Figure 2). Donkor et al. found that TGF- β -deficient T cells were more effective at mediating immune surveillance and curtailing tumor growth in murine systems, thereby unveiling that T cells are a significant source of TGF- β that impede anti-tumor responses(631, 695). Interestingly, in their models of prostate cancer, CD4⁺ T-cell-derived TGF- β (conventional and Tregs) was relevant to the prevention of spontaneous tumor formation while conventional T-cell TGF- β production impeded the immune-mediated restriction of tumor growth and metastasis. However, the relative contribution of cancer cell/stroma versus T-cell and other immune cell-derived TGF- β in humans remains ill-defined.

Therapeutic opportunities. Irrespective of source, TGF- β will directly suppress T-cell activation and overall favor immunoregulatory differentiation (Figure 1, Figure 2 and as reviewed above). Within cancer microenvironments, TGF- β will further accentuate the suppression of T cells by inhibiting dendritic cell, macrophage and neutrophil maturation and polarization as inflammatory cells thereby limiting antigen presentation and Th1 promoting cytokine secretion(354, 409, 423). Non-immune cells will also impact T-cell biology in a TGF- β -dependent manner (Figure 2). Recent data highlight the importance of TGF- β expression within the stromal component of certain urothelial cancer patients treated with atezolizumab, an anti-PD-L1 blocking antibody(693). The authors found an association between a TGF- β gene expression signature and poor response to treatment in tumors where T cells are excluded from the tumor parenchyma and retained in the fibroblast and collagen-rich regions around neoplastic cells. Using a mouse model where tumor T-cell exclusion is observed, the simultaneous blockade of TGF- β and PD-L1 led to improved CD8⁺ T-cell infiltration and better tumor control. The combination of PD-1/PD-L1 axis blockade and TGF- β inhibition has also shown promising results in a model of metastatic colon cancer characterized by low mutational load, T-cell exclusion and TGF- β signaling in the stroma(434). In this study, TGF- β signaling blockade rendered previously resistant colon cancer lesions susceptible to PD-1/PD-L1-blockade. The precise mechanisms through which TGF- β inhibition/blockade alters T-cell responses to PD-1/PD-L1 blockade in these models remain unclear. One can speculate on a putative role of the stroma or perhaps consider an additive effect, as TGF- β was shown to increase PD-1 expression in cancer-infiltrating mouse T cells(696, 697). This was shown to occur through direct SMAD-dependent mechanisms as well as indirectly through the SMAD-mediated inhibition of SATB1 expression, a chromatin organizer/transcription factor which was shown to suppress the transcription of the PD-1 gene. These studies add to a growing body of literature supporting the use of TGF- β blockade in combination with other immunomodulatory agents such as OX40 agonistic antibodies(426), IL-2(427) or even radiation therapy(698). Pre-clinical evidence

also support the rationale of combining TGF- β and vascular-endothelial growth factor (VEGF) blockade to synergistically enhance anti-tumor immunity (699). Likewise, the combination of TGF- β with oncolytic viruses can potentially increase immune-based tumor control (428). In addition, the inhibition of TGF- β in combination with vaccination has also shown great promise in pre-clinical settings(429-432, 700) but has not provided a clear indication of clinical efficacy to this date(425). Likewise, early phase studies using single agents to block TGF- β conversion from latent sources or TGF- β signaling have yielded conflicting results, some of them nonetheless encouraging in subgroups of patients (reviewed in(354, 425)). Hence, despite a strong rationale supporting the use of TGF- β blocking agents or small molecule signal inhibitors in order to reverse the multipronged role of TGF- β within cancer microenvironments, there is currently limited clinical data demonstrating substantial objective cancer responses or evidence of clinically significant immune reactivity against neoplastic cells. However, investment in rationally planned combination trials using potent immunotherapeutic strategies may be the best approach to harness the potential of TGF- β inhibition to enhance anti-cancer responses. One of such combination approach is to design T-cell therapies that combine precise cancer antigen targeting and TGF- β insensitivity through gene engineering on the same T cell. The *ex vivo* expansion and engineering of T cells allows for the generation of T-cell therapeutic products that can recognize antigens on tumor cells through their natural or artificial receptors (e.g. CAR)(701-704). The adoptive transfer of such T cells has yielded spectacular clinical results in selected indications, but overcoming the immunosuppressive cancer microenvironment remains a limitation of these therapies(632). The engineering of dnTGF β R2-expressing *ex vivo* expanded T cells, either targeted to the tumor through their natural receptors or CARs, has improved the efficacy of adoptive immunotherapy in numerous pre-clinical models (221, 435, 437, 438, 704). A recently reported clinical study using Epstein-Barr virus (EBV)-specific T cells overexpressing a dnTGF β R2 on eight refractory EBV⁺ Hodgkin's lymphoma patients showed that the transferred T cells can expand and persist after infusion. These T cells brought partial or complete responses in half of the patients without significant side effects(439). These encouraging results should nonetheless be confirmed in larger cohorts.

Conclusions and perspectives

Most cell types that compose the neoplastic microenvironment are impacted by TGF- β signaling. Although the role of TGF- β on T-cells in the context of cancer has been extensively studied, several uncertainties will require clarification before we will be able to fully harness the therapeutic potential of TGF- β signaling modulation in clinical settings. The current strategies aiming at interrupting TGF- β signaling, either systematically or in T cells alone, will require careful monitoring to define how the negative effects of TGF- β on T cells can be abrogated without compromising homeostatic functions and plausible beneficial effects on certain inflammatory T-cell subsets. Given the widespread autoimmune phenotypes found in mice deficient for TGF- β or components of the TGF- β signaling pathway, careful assessments of toxicities will be required. Although the initial studies using TGF- β inhibition were reassuring from a safety stand point(424), the future of immune-oncology will be based on combination immunotherapies and whether TGF- β blockade/inhibition will potentialize the immune toxicities of currently used agents, such as checkpoint inhibitors, is currently unknown(705). Likewise, systemic TGF- β inhibition may have important adverse effect on tissue homeostasis, including hematopoietic stem cell quiescence.

Thus, , one can anticipate that important variables to maximally exploit a yet undetermined therapeutic window will be TGF- β concentration, timing of TGF- β signaling blockade and combinations with other treatments. A study by Nizard et al. illustrates how important the timing and target T-cell population is in the context of TGF- β signaling modulation(706). In their Human

Papilloma Virus (HPV) cancer model, the inhibition of Trm differentiation through TGF- β blockade in the context of vaccination was associated with decreased T-cell tumor infiltration and increased cancer mortality. Hence, mobilizing the TGF- β -mediated effects on Trm differentiation may improve the immune targeting of cancers, but inhibition of TGF- β signaling within tumors can make infiltrating T cells more cytotoxic. The design of molecular switches enabling T cells to benefit from the positive effects of TGF- β on Trm or Th9 differentiation or maintenance of T-cell memory for instance, while permitting the timely abrogation of TGF- β within tumor microenvironments may finally offer an opportunity to exploit the full spectrum of TGF- β 's pleiotropy in cancer T-cell therapy.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the members of the Delisle Lab for helpful discussions and apologize to the scientists whose important contributions could not be discussed in this review. This work is supported by grants from the Canadian Cancer Society Research Institute (grant #705207) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2018-05631). JSD is a Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS) scholar.

Author contribution. Both AD and JSD performed the literature review, wrote, reviewed and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of interest. The authors declare that they have no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of this review, the writing of the manuscript or the decision to publish.

References

1. David, C.J.; Massague, J. Contextual determinants of TGF- β action in development, immunity and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gaarenstroom, T.; Hill, C.S. TGF- β signaling to chromatin: How Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *32*, 107–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Savage-Dunn, C. TGF- β signaling. *WormBook* **2005**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Itoh, S.; ten Dijke, P. Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, *19*, 176–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Clarke, D.C.; Liu, X. Decoding the quantitative nature of TGF- β /Smad signaling. *Trends Cell Biol.* **2008**, *18*, 430–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chen, Y.G. Endocytic regulation of TGF- β signaling. *Cell Res.* **2009**, *19*, 58–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhang, Y.E. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* **2009**, *19*, 128–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Mu, Y.; Gudey, S.K.; Landstrom, M. Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* **2011**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ayyaz, A.; Attisano, L.; Wrana, J.L. Recent advances in understanding contextual TGF- β signaling. *F1000Research* **2017**, *6*, 749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Tian, M.; Neil, J.R.; Schiemann, W.P. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 951–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Yang, L.; Pang, Y.; Moses, H.L. TGF- β and immune cells: An important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* **2010**, *31*, 220–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zitvogel, L.; Tesniere, A.; Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 715–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dunn, G.P.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **2004**, *21*, 137–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Flavell, R.A.; Sanjabi, S.; Wrzesinski, S.H.; Licona-Limon, P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF- β . *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 554–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Cohen, R.; Cros, J.; Faivre, S.; Raymond, E.; de Gramont, A. Targeting the TGF- β pathway for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *147*, 22–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Pickup, M.W.; Owens, P.; Moses, H.L. TGF- β , Bone Morphogenetic Protein, and Activin Signaling and the Tumor Microenvironment. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a022285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Topalian, S.L.; Weiner, G.J.; Pardoll, D.M. Cancer immunotherapy comes of age. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 4828–4836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Sanjabi, S.; Oh, S.A.; Li, M.O. Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a022236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Travis, M.A.; Sheppard, D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **2014**, *32*, 51–82.

[CrossRef] [PubMed]

20. Shull, M.M.; Ormsby, I.; Kier, A.B.; Pawlowski, S.; Diebold, R.J.; Yin, M.; Allen, R.; Sidman, C.; Proetzel, G.; Calvin, D.; et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **1992**, *359*, 693–699. [CrossRef] [PubMed]
21. Kulkarni, A.B.; Huh, C.G.; Becker, D.; Geiser, A.; Lyght, M.; Flanders, K.C.; Roberts, A.B.; Sporn, M.B.; Ward, J.M.; Karlsson, S. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 770–774. [CrossRef] [PubMed]
22. Yaswen, L.; Kulkarni, A.B.; Fredrickson, T.; Mittleman, B.; Schiffman, R.; Payne, S.; Longenecker, G.; Mozes, E.; Karlsson, S. Autoimmune manifestations in the transforming growth factor- β 1 knockout mouse. *Blood* **1996**, *87*, 1439–1445. [PubMed]
23. Li, M.O.; Wan, Y.Y.; Sanjabi, S.; Robertson, A.K.; Flavell, R.A. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 99–146. [CrossRef] [PubMed]
24. Gorelik, L.; Flavell, R.A. Abrogation of TGF β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* **2000**, *12*, 171–181. [CrossRef]
25. Li, M.O.; Sanjabi, S.; Flavell, R.A. Transforming growth factor- β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* **2006**, *25*, 455–471. [CrossRef] [PubMed]
26. Marie, J.C.; Liggitt, D.; Rudensky, A.Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- β receptor. *Immunity* **2006**, *25*, 441–454. [CrossRef] [PubMed]
27. Liu, Y.; Zhang, P.; Li, J.; Kulkarni, A.B.; Perruche, S.; Chen, W. A critical function for TGF β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 632–640. [CrossRef] [PubMed]
28. Diebold, R.J.; Eis, M.J.; Yin, M.; Ormsby, I.; Boivin, G.P.; Darrow, B.J.; Saffitz, J.E.; Doetschman, T. Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor β 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 12215–12219. [CrossRef] [PubMed]
29. Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M.; Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **1995**, *155*, 1151–1164. [PubMed]
30. Annes, J.P.; Munger, J.S.; Rifkin, D.B. Making sense of latent TGF β activation. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 217–224. [CrossRef] [PubMed]
31. Yang, Z.; Mu, Z.; Dabovic, B.; Jurukovski, V.; Yu, D.; Sung, J.; Xiong, X.; Munger, J.S. Absence of integrin-mediated TGF β 1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGF β 1-null mice. *J. Cell Biol.* **2007**, *176*, 787–793. [CrossRef] [PubMed]
32. Travis, M.A.; Reizis, B.; Melton, A.C.; Masteller, E.; Tang, Q.; Proctor, J.M.; Wang, Y.; Bernstein, X.; Huang, X.; Reichardt, L.F.; et al. Loss of integrin α v β 8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* **2007**, *449*, 361–365. [CrossRef] [PubMed]
33. Worthington, J.J.; Czajkowska, B.I.; Melton, A.C.; Travis, M.A. Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor- β and induce Foxp3⁺ regulatory T cells via integrin α v β 8. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 1802–1812. [CrossRef] [PubMed]
34. Melton, A.C.; Bailey-Bucktrout, S.L.; Travis, M.A.; Fife, B.T.; Bluestone, J.A.; Sheppard, D. Expression of α v β 8 integrin on dendritic cells regulates Th17 cell development and experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 4436–4444. [CrossRef] [PubMed]
35. Wang, R.; Wan, Q.; Kozhaya, L.; Fujii, H.; Unutmaz, D. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2705. [CrossRef] [PubMed]
36. Stockis, J.; Colau, D.; Coulie, P.G.; Lucas, S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF β on the surface of activated human Treg. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 3315–3322. [CrossRef] [PubMed]
37. Tran, D.Q.; Andersson, J.; Wang, R.; Ramsey, H.; Unutmaz, D.; Shevach, E.M. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF β on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13445–13450. [CrossRef] [PubMed]
38. Wang, R.; Kozhaya, L.; Mercer, F.; Khaitan, A.; Fujii, H.; Unutmaz, D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13439–13444. [CrossRef] [PubMed]
39. Edwards, J.P.; Thornton, A.M.; Shevach, E.M. Release of active TGF β 1 from the latent TGF β 1/GARP complex on T regulatory cells is mediated by integrin α v β 8. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 2843–2849. [CrossRef] [PubMed]
40. Worthington, J.J.; Kelly, A.; Smedley, C.; Bauche, D.; Campbell, S.; Marie, J.C.; Travis, M.A. Integrin α v β 8-Mediated TGF β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* **2015**, *42*, 903–915. [CrossRef] [PubMed]
41. Feng, X.H.; Derynck, R. Specificity and versatility in TGF β signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 659–693. [CrossRef] [PubMed]

42. Massague, J.; Seoane, J.; Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2783–2810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gorelik, L.; Constant, S.; Flavell, R.A. Mechanism of transforming growth factor β -induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 1499–1505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lucas, P.J.; Kim, S.J.; Melby, S.J.; Gress, R.E. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor β II receptor. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 1187–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhang, N.; Bevan, M.J. TGF β signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 667–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lucas, P.J.; McNeil, N.; Hilgenfeld, E.; Choudhury, B.; Kim, S.J.; Eckhaus, M.A.; Ried, T.; Gress, R.E. Transforming growth factor- β pathway serves as a primary tumor suppressor in CD8 $^{+}$ T cell tumorigenesis. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6524–6529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhu, Y.; Richardson, J.A.; Parada, L.F.; Graff, J.M. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* **1998**, *94*, 703–714. [[CrossRef](#)]
48. Hahn, J.N.; Falck, V.G.; Jirik, F.R. Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17-associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 4030–4042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Blank, U.; Karlsson, S. TGF β signaling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood* **2015**, *125*, 3542–3550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Chabanon, A.; Desterke, C.; Rodenburger, E.; Clay, D.; Guerton, B.; Boutin, L.; Bennaceur-Griscelli, A.; Pierre-Louis, O.; Uzan, G.; Abecassis, L.; et al. A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor- β controls the quiescence/cycling switch of CD34 $^{+}$ progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin. *Stem Cells* **2008**, *26*, 3150–3161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Jiang, L.; Han, X.; Wang, J.; Wang, C.; Sun, X.; Xie, J.; Wu, G.; Phan, H.; Liu, Z.; Zhang, C.; et al. SHP-1 regulates hematopoietic stem cell quiescence by coordinating TGF β signaling. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 1337–1347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kehrl, J.H.; Wakefield, L.M.; Roberts, A.B.; Jakowlew, S.; Alvarez-Mon, M.; Derynck, R.; Sporn, M.B.; Fauci, A.S. Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* **1986**, *163*, 1037–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. McKarns, S.C.; Schwartz, R.H.; Kaminski, N.E. Smad3 is essential for TGF β 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 4275–4284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Brabletz, T.; Pfeuffer, I.; Schorr, E.; Siebelt, F.; Wirth, T.; Serfling, E. Transforming growth factor β and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 1155–1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wolfraim, L.A.; Walz, T.M.; James, Z.; Fernandez, T.; Letterio, J.J. p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF β -mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 3093–3102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ruegemer, J.J.; Ho, S.N.; Augustine, J.A.; Schlager, J.W.; Bell, M.P.; McKean, D.J.; Abraham, R.T. Regulatory effects of transforming growth factor- β on IL-2- and IL-4-dependent T cell-cycle progression. *J. Immunol.* **1990**, *144*, 1767–1776. [[PubMed](#)]
57. Li, L.; Iwamoto, Y.; Berezovskaya, A.; Boussiotis, V.A. A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27Kip1 and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance. *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 1157–1165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Yang, X.; Letterio, J.J.; Lechleider, R.J.; Chen, L.; Hayman, R.; Gu, H.; Roberts, A.B.; Deng, C. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF β . *EMBO J.* **1999**, *18*, 1280–1291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Giroux, M.; Delisle, J.S.; Gauthier, S.D.; Heinonen, K.M.; Hinsinger, J.; Houde, B.; Gaboury, L.; Brochu, S.; Wu, J.; Hebert, M.J.; et al. SMAD3 prevents graft-versus-host disease by restraining Th1 differentiation and granulocyte-mediated tissue damage. *Blood* **2011**, *117*, 1734–1744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Datto, M.B.; Frederick, J.P.; Pan, L.; Borton, A.J.; Zhuang, Y.; Wang, X.F. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor β -mediated signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 2495–2504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. McKarns, S.C.; Schwartz, R.H. Distinct effects of TGF β 1 on CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cell survival, division, and IL-2 production: A role for T cell intrinsic Smad3. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 2071–2083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ishigame, H.; Mosaheb, M.M.; Sanjabi, S.; Flavell, R.A. Truncated form of TGF β -RII, but not its absence, induces memory CD8 $^{+}$ T cell expansion and lymphoproliferative disorder in mice. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 6340–6350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Delisle, J.S.; Giroux, M.; Boucher, G.; Landry, J.R.; Hardy, M.P.; Lemieux, S.; Jones, R.G.; Wilhelm, B.T.; Perreault, C. The TGF β -Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells. *Genes Immun.* **2013**, *14*, 115–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

64. Viel, S.; Marcais, A.; Guimaraes, F.S.; Loftus, R.; Rabilloud, J.; Grau, M.; Degouve, S.; Djebali, S.; Sanlaville, A.; Charrier, E.; et al. TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal.* **2016**, *9*, ra19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chen, C.H.; Seguin-Devaux, C.; Burke, N.A.; Oriss, T.B.; Watkins, S.C.; Clipstone, N.; Ray, A. Transforming growth factor β blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 1689–1699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Bousiotis, V.A.; Chen, Z.M.; Zeller, J.C.; Murphy, W.J.; Berezovskaya, A.; Narula, S.; Roncarolo, M.G.; Blazar, B.R. Altered T-cell receptor + CD28-mediated signaling and blocked cell cycle progression in interleukin 10 and transforming growth factor- β -treated alloreactive T cells that do not induce graft-versus-host disease. *Blood* **2001**, *97*, 565–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Choudhry, M.A.; Sir, O.; Sayeed, M.M. TGF- β abrogates TCR-mediated signaling by upregulating tyrosine phosphatases in T cells. *Shock* **2001**, *15*, 193–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Riese, M.J.; Wang, L.C.; Moon, E.K.; Joshi, R.P.; Ranganathan, A.; June, C.H.; Koretzky, G.A.; Albelda, S.M. Enhanced effector responses in activated CD8⁺ T cells deficient in diacylglycerol kinases. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3566–3577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Giroux, M.; Delisle, J.S.; O'Brien, A.; Hebert, M.J.; Perreault, C. T cell activation leads to protein kinase C theta-dependent inhibition of TGF- β signaling. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 1568–1576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Cottrez, F.; Groux, H. Regulation of TGF- β response during T cell activation is modulated by IL-10. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 773–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Thomas, D.A.; Massague, J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 369–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Gorelik, L.; Flavell, R.A. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in T cells. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1118–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Donkor, M.K.; Sarkar, A.; Savage, P.A.; Franklin, R.A.; Johnson, L.K.; Jungbluth, A.A.; Allison, J.P.; Li, M.O. T cell surveillance of oncogene-induced prostate cancer is impeded by T cell-derived TGF- β 1 cytokine. *Immunity* **2011**, *35*, 123–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bollard, C.M.; Rossig, C.; Calonge, M.J.; Huls, M.H.; Wagner, H.J.; Massague, J.; Brenner, M.K.; Heslop, H.E.; Rooney, C.M. Adapting a transforming growth factor β -related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood* **2002**, *99*, 3179–3187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Chou, C.K.; Schietinger, A.; Liggitt, H.D.; Tan, X.; Funk, S.; Freeman, G.J.; Ratliff, T.L.; Greenberg, N.M.; Greenberg, P.D. Cell-intrinsic abrogation of TGF- β signaling delays but does not prevent dysfunction of self/tumor-specific CD8 T cells in a murine model of autochthonous prostate cancer. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 3936–3946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Sullivan, B.M.; Juedes, A.; Szabo, S.J.; von Herrath, M.; Glimcher, L.H. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15818–15823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Pearce, E.L.; Mullen, A.C.; Martins, G.A.; Krawczyk, C.M.; Hutchins, A.S.; Zediak, V.P.; Banica, M.; DiCioccio, C.B.; Gross, D.A.; Mao, C.A.; et al. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* **2003**, *302*, 1041–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Intlekofer, A.M.; Banerjee, A.; Takemoto, N.; Gordon, S.M.; Dejong, C.S.; Shin, H.; Hunter, C.A.; Wherry, E.J.; Lindsten, T.; Reiner, S.L. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8⁺ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* **2008**, *321*, 408–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Cruz-Guilloty, F.; Pipkin, M.E.; Djuretic, I.M.; Levanon, D.; Lotem, J.; Lichtenheld, M.G.; Groner, Y.; Rao, A. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 51–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Zhu, Y.; Ju, S.; Chen, E.; Dai, S.; Li, C.; Morel, P.; Liu, L.; Zhang, X.; Lu, B. T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 3174–3183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Yoon, J.H.; Jung, S.M.; Park, S.H.; Kato, M.; Yamashita, T.; Lee, I.K.; Sudo, K.; Nakae, S.; Han, J.S.; Kim, O.H.; et al. Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 1720–1739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Ahmadzadeh, M.; Rosenberg, S.A. TGF- β 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 5215–5223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Rutishauser, R.L.; Martins, G.A.; Kalachikov, S.; Chandele, A.; Parish, I.A.; Meffre, E.; Jacob, J.; Calame, K.; Kaech, S.M. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8⁺ T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* **2009**, *31*, 296–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kallies, A.; Xin, A.; Belz, G.T.; Nutt, S.L. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* **2009**, *31*, 283–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Lin, R.; Chen, L.; Chen, G.; Hu, C.; Jiang, S.; Sevilla, J.; Wan, Y.; Sampson, J.H.; Zhu, B.; Li, Q.J. Targeting miR-23a in CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes prevents tumor-dependent immunosuppression. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 5352–5367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

86. Ouyang, W.; Beckett, O.; Ma, Q.; Li, M.O. Transforming growth factor- β signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* **2010**, *32*, 642–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Stritesky, G.L.; Jameson, S.C.; Hogquist, K.A. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* **2012**, *30*, 95–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Robinson, R.T.; Gorham, J.D. TGF- β 1 regulates antigen-specific CD4+ T cell responses in the periphery. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 71–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Filippi, C.M.; Juedes, A.E.; Oldham, J.E.; Ling, E.; Togher, L.; Peng, Y.; Flavell, R.A.; von Herrath, M.G. Transforming growth factor- β suppresses the activation of CD8+ T-cells when naive but promotes their survival and function once antigen experienced: A two-faced impact on autoimmunity. *Diabetes* **2008**, *57*, 2684–2692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Ma, C.; Zhang, N. Transforming growth factor- β signaling is constantly shaping memory T-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 11013–11017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Lewis, G.M.; Wehrens, E.J.; Labarta-Bajo, L.; Streeck, H.; Zuniga, E.I. TGF- β receptor maintains CD4 T helper cell identity during chronic viral infections. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 3799–3813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Sanjabi, S.; Mosaheb, M.M.; Flavell, R.A. Opposing effects of TGF- β and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity* **2009**, *31*, 131–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Guan, T.; Dominguez, C.X.; Amezquita, R.A.; Laidlaw, B.J.; Cheng, J.; Henao-Mejia, J.; Williams, A.; Flavell, R.A.; Lu, J.; Kaech, S.M. ZEB1, ZEB2, and the miR-200 family form a counterregulatory network to regulate CD8(+) T cell fates. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 1153–1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Gregory, P.A.; Bracken, C.P.; Smith, E.; Bert, A.G.; Wright, J.A.; Roslan, S.; Morris, M.; Wyatt, L.; Farshid, G.; Lim, Y.Y.; et al. An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 1686–1698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Larsen, J.E.; Nathan, V.; Osborne, J.K.; Farrow, R.K.; Deb, D.; Sullivan, J.P.; Dospoy, P.D.; Augustyn, A.; Hight, S.K.; Sato, M.; et al. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 3219–3235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Rateitschak, K.; Kaderali, L.; Wolkenhauer, O.; Jaster, R. Autocrine TGF- β /ZEB/microRNA-200 signal transduction drives epithelial-mesenchymal transition: Kinetic models predict minimal drug dose to inhibit metastasis. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 861–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Zhu, J.; Yamane, H.; Paul, W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 445–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Gorelik, L.; Fields, P.E.; Flavell, R.A. Cutting edge: TGF- β inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 4773–4777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Lin, J.T.; Martin, S.L.; Xia, L.; Gorham, J.D. TGF- β 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: Differential involvement of Stat4 and T-bet. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 5950–5958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Fantini, M.C.; Becker, C.; Monteleone, G.; Pallone, F.; Galle, P.R.; Neurath, M.F. Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4+CD25 $^+$ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 5149–5153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Selvaraj, R.K.; Geiger, T.L. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF- β . *J. Immunol.* **2007**, *178*, 7667–7677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Chen, W.; Jin, W.; Hardegen, N.; Lei, K.J.; Li, L.; Marinos, N.; McGrady, G.; Wahl, S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25 $^+$ naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1875–1886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Peng, Y.; Laouar, Y.; Li, M.O.; Green, E.A.; Flavell, R.A. TGF- β regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4572–4577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Schmidt, A.; Oberle, N.; Krammer, P.H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Tone, Y.; Furuuchi, K.; Kojima, Y.; Tykocinski, M.L.; Greene, M.I.; Tone, M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 194–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Ghiringhelli, F.; Puig, P.E.; Roux, S.; Parcellier, A.; Schmitt, E.; Solary, E.; Kroemer, G.; Martin, F.; Chauffert, B.; Zitvogel, L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 919–929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Valzasina, B.; Piconese, S.; Guiducci, C.; Colombo, M.P. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25 $^+$ lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4488–4495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Liu, V.C.; Wong, L.Y.; Jang, T.; Shah, A.H.; Park, I.; Yang, X.; Zhang, Q.; Lonning, S.; Teicher, B.A.; Lee, C. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25 $^+$ T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: Role of tumor-derived TGF- β . *J. Immunol.* **2007**, *178*, 2883–2892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Bailey, S.R.; Nelson, M.H.; Himes, R.A.; Li, Z.; Mehrotra, S.; Paulos, C.M. Th17 cells in cancer: The ultimate identity crisis. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

110. Ivanov, I.I.; McKenzie, B.S.; Zhou, L.; Tadokoro, C.E.; Lepelley, A.; Lafaille, J.J.; Cua, D.J.; Littman, D.R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **2006**, *126*, 1121–1133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Salehi, S.; Bankoti, R.; Benevides, L.; Willen, J.; Couse, M.; Silva, J.S.; Dhall, D.; Meffre, E.; Targan, S.; Martins, G.A. B lymphocyte-induced maturation protein-1 contributes to intestinal mucosa homeostasis by limiting the number of IL-17-producing CD4+ T cells. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 5682–5693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Das, J.; Ren, G.; Zhang, L.; Roberts, A.I.; Zhao, X.; Bothwell, A.L.; Van Kaer, L.; Shi, Y.; Das, G. Transforming growth factor β is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 2407–2416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Zhu, J.; Davidson, T.S.; Wei, G.; Jankovic, D.; Cui, K.; Schones, D.E.; Guo, L.; Zhao, K.; Shevach, E.M.; Paul, W.E. Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF- β is important for differentiation of Th17 and CD103+ inducible regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 329–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Zhou, L.; Lopes, J.E.; Chong, M.M.; Ivanov, I.I.; Min, R.; Vitorica, G.D.; Shen, Y.; Du, J.; Rubtsov, Y.P.; Rudensky, A.Y.; et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature* **2008**, *453*, 236–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Hasan, M.; Neumann, B.; Hauptelshofer, S.; Stahlke, S.; Fantini, M.C.; Angstwurm, K.; Bogdahn, U.; Kleiter, I. Activation of TGF- β -induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. *Immunol. Cell Biol.* **2015**, *93*, 662–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Zhang, S.; Takaku, M.; Zou, L.; Gu, A.D.; Chou, W.C.; Zhang, G.; Wu, B.; Kong, Q.; Thomas, S.Y.; Serody, J.S.; et al. Reversing SKI-SMAD4-mediated suppression is essential for Th17 cell differentiation. *Nature* **2017**, *551*, 105–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Yang, X.O.; Nurieva, R.; Martinez, G.J.; Kang, H.S.; Chung, Y.; Pappu, B.P.; Shah, B.; Chang, S.H.; Schluns, K.S.; Watowich, S.S.; et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* **2008**, *29*, 44–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Allard, B.; Longhi, M.S.; Robson, S.C.; Stagg, J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.* **2017**, *276*, 121–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Chalmin, F.; Mignot, G.; Bruchard, M.; Chevriaux, A.; Vegran, F.; Hichami, A.; Ladoire, S.; Derangere, V.; Vincent, J.; Masson, D.; et al. STAT3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* **2012**, *36*, 362–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Singh, B.; Schwartz, J.A.; Sandrock, C.; Bellemore, S.M.; Nikoopour, E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *Indian J. Med. Res.* **2013**, *138*, 591–594. [[PubMed](#)]
121. Bellemore, S.M.; Nikoopour, E.; Schwartz, J.A.; Krougly, O.; Lee-Chan, E.; Singh, B. Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin. Exp. Immunol.* **2015**, *182*, 261–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Ghoreschi, K.; Laurence, A.; Yang, X.P.; Tato, C.M.; McGeachy, M.J.; Konkel, J.E.; Ramos, H.L.; Wei, L.; Davidson, T.S.; Bouladoux, N.; et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* **2010**, *467*, 967–971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Rivera Vargas, T.; Humblin, E.; Vegran, F.; Ghiringhelli, F.; Apetoh, L. TH9 cells in anti-tumor immunity. *Semin. Immunopathol.* **2017**, *39*, 39–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Fischer, M.; Bijman, M.; Molin, D.; Cormont, F.; Uyttenhove, C.; van Snick, J.; Sundstrom, C.; Enblad, G.; Nilsson, G. Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **2003**, *17*, 2513–2516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Fang, Y.; Chen, X.; Bai, Q.; Qin, C.; Mohamud, A.O.; Zhu, Z.; Ball, T.W.; Ruth, C.M.; Newcomer, D.R.; Herrick, E.J.; et al. IL-9 inhibits HTB-72 melanoma cell growth through upregulation of p21 and TRAIL. *J. Surg. Oncol.* **2015**, *111*, 969–974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Lu, Y.; Hong, S.; Li, H.; Park, J.; Hong, B.; Wang, L.; Zheng, Y.; Liu, Z.; Xu, J.; He, J.; et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 4160–4171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Zhao, Y.; Chu, X.; Chen, J.; Wang, Y.; Gao, S.; Jiang, Y.; Zhu, X.; Tan, G.; Zhao, W.; Yi, H.; et al. Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumor immunity through the induction of Th9 cells. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Kim, I.K.; Kim, B.S.; Koh, C.H.; Seok, J.W.; Park, J.S.; Shin, K.S.; Bae, E.A.; Lee, G.E.; Jeon, H.; Cho, J.; et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein co-stimulation facilitates tumor regression by inducing IL-9-producing helper T cells. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1010–1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Xiao, X.; Shi, X.; Fan, Y.; Zhang, X.; Wu, M.; Lan, P.; Minze, L.; Fu, Y.X.; Ghobrial, R.M.; Liu, W.; et al. GITR subverts Foxp3(+) Tregs to boost Th9 immunity through regulation of histone acetylation. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Nonomura, Y.; Otsuka, A.; Nakashima, C.; Seidel, J.A.; Kitoh, A.; Dainichi, T.; Nakajima, S.; Sawada, Y.; Matsushita, S.; Aoki, M.; et al. Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1248327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

131. Chaput, N.; Louafi, S.; Bardier, A.; Charlotte, F.; Vaillant, J.C.; Menegaux, F.; Rosenzweig, M.; Lemoine, F.; Klatzmann, D.; Taieb, J. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* **2009**, *58*, 520–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Dwivedi, V.P.; Tousif, S.; Bhattacharya, D.; Prasad, D.V.; Van Kaer, L.; Das, J.; Das, G. Transforming growth factor- β protein inversely regulates in vivo differentiation of interleukin-17 (IL-17)-producing CD4+ and CD8+ T cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 2943–2947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Lu, Y.; Hong, B.; Li, H.; Zheng, Y.; Zhang, M.; Wang, S.; Qian, J.; Yi, Q. Tumor-specific IL-9-producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 2265–2270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Schenkel, J.M.; Masopust, D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity* **2014**, *41*, 886–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Mackay, L.K.; Rahimpour, A.; Ma, J.Z.; Collins, N.; Stock, A.T.; Hafon, M.L.; Vega-Ramos, J.; Lauzurica, P.; Mueller, S.N.; Stefanovic, T.; et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1294–1301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Skon, C.N.; Lee, J.Y.; Anderson, K.G.; Masopust, D.; Hogquist, K.A.; Jameson, S.C. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1285–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Mackay, L.K.; Wynne-Jones, E.; Freestone, D.; Pellicci, D.G.; Mielke, L.A.; Newman, D.M.; Braun, A.; Masson, F.; Kallies, A.; Belz, G.T.; et al. T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF- β and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity* **2015**, *43*, 1101–1111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Webb, J.R.; Milne, K.; Watson, P.; Deleeuw, R.J.; Nelson, B.H. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 434–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Djenidi, F.; Adam, J.; Goubar, A.; Durgeau, A.; Meurice, G.; de Montpreville, V.; Validire, P.; Besse, B.; Mami-Chouaib, F. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 3475–3486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Webb, J.R.; Milne, K.; Nelson, B.H. PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2015**, *3*, 926–935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Wang, Z.Q.; Milne, K.; Derocher, H.; Webb, J.R.; Nelson, B.H.; Watson, P.H. CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Ansell, S.M.; Lesokhin, A.M.; Borrello, I.; Halwani, A.; Scott, E.C.; Gutierrez, M.; Schuster, S.J.; Millenson, M.M.; Cattry, D.; Freeman, G.J.; et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 311–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Borghaei, H.; Paz-Ares, L.; Horn, L.; Spigel, D.R.; Steins, M.; Ready, N.E.; Chow, L.Q.; Vokes, E.E.; Felip, E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1627–1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Brahmer, J.; Reckamp, K.L.; Baas, P.; Crino, L.; Eberhardt, W.E.; Poddubskaya, E.; Antonia, S.; Pluzanski, A.; Vokes, E.E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 123–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Rosenberg, S.A.; Restifo, N.P.; Yang, J.C.; Morgan, R.A.; Dudley, M.E. Adoptive cell transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 299–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Rosenberg, S.A. Raising the bar: The curative potential of human cancer immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 127–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Rook, A.H.; Kehr, J.H.; Wakefield, L.M.; Roberts, A.B.; Sporn, M.B.; Burlington, D.B.; Lane, H.C.; Fauci, A.S. Effects of transforming growth factor β on the functions of natural killer cells: Depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J. Immunol.* **1986**, *136*, 3916–3920. [[PubMed](#)]
148. Yu, J.; Wei, M.; Becknell, B.; Trotta, R.; Liu, S.; Boyd, Z.; Jaung, M.S.; Blaser, B.W.; Sun, J.; Benson, D.M., Jr.; et al. Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: Reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity* **2006**, *24*, 575–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Trotta, R.; Col, J.D.; Yu, J.; Ciarlariello, D.; Thomas, B.; Zhang, X.; Allard, J., 2nd; Wei, M.; Mao, H.; Byrd, J.C.; et al. TGF- β utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 3784–3792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Castriconi, R.; Cantoni, C.; Della Chiesa, M.; Vitale, M.; Marcenaro, E.; Conte, R.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Moretta, L.; Moretta, A. Transforming growth factor β 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4120–4125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Casetti, R.; Agrati, C.; Wallace, M.; Sacchi, A.; Martini, F.; Martino, A.; Rinaldi, A.; Malkovsky, M. Cutting edge: TGF- β 1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 3574–3577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

152. Li, X.; Kang, N.; Zhang, X.; Dong, X.; Wei, W.; Cui, L.; Ba, D.; He, W. Generation of human regulatory gammadelta T cells by TCRgammadelta stimulation in the presence of TGF- β and their involvement in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 6693–6700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Cortez, V.S.; Cervantes-Barragan, L.; Robinette, M.L.; Bando, J.K.; Wang, Y.; Geiger, T.L.; Gilfillan, S.; Fuchs, A.; Vivier, E.; Sun, J.C.; et al. Transforming Growth Factor- β Signaling Guides the Differentiation of Innate Lymphoid Cells in Salivary Glands. *Immunity* **2016**, *44*, 1127–1139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Dadi, S.; Chhangawala, S.; Whitlock, B.M.; Franklin, R.A.; Luo, C.T.; Oh, S.A.; Toure, A.; Pritykin, Y.; Huse, M.; Leslie, C.S.; et al. Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell* **2016**, *164*, 365–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Gao, Y.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Bald, T.; Ng, S.S.; Young, A.; Ngiow, S.F.; Rautela, J.; Straube, J.; Waddell, N.; Blake, S.J.; et al. Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 1004–1015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Carli, C.; Giroux, M.; Delisle, J.S. Roles of Transforming Growth Factor- β in Graft-versus-Host and Graft-versus-Tumor Effects. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2012**, *18*, 1329–1340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Fuxe, J.; Vincent, T.; Garcia de Herreros, A. Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 2363–2374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Wendt, M.K.; Allington, T.M.; Schiemann, W.P. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF- β . *Future Oncol.* **2009**, *5*, 1145–1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Pardali, E.; ten Dijke, P. Transforming growth factor- β signaling and tumor angiogenesis. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 4848–4861. [[CrossRef](#)]
160. Massague, J. TGF- β in Cancer. *Cell* **2008**, *134*, 215–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Galon, J.; Costes, A.; Sanchez-Cabo, F.; Kirilovsky, A.; Mlecnik, B.; Lagorce-Pages, C.; Tosolini, M.; Camus, M.; Berger, A.; Wind, P.; et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **2006**, *313*, 1960–1964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Galon, J.; Mlecnik, B.; Bindea, G.; Angell, H.K.; Berger, A.; Lagorce, C.; Lugli, A.; Zlobec, I.; Hartmann, A.; Bifulco, C.; et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 199–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Thorsson, V.; Gibbs, D.L.; Brown, S.D.; Wolf, D.; Bortone, D.S.; Ou Yang, T.H.; Porta-Pardo, E.; Gao, G.F.; Plaisier, C.L.; Eddy, J.A.; et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* **2018**, *48*, 812–830.e14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Spranger, S.; Sivan, A.; Corrales, L.; Gajewski, T.F. Tumor and Host Factors Controlling Antitumor Immunity and Efficacy of Cancer Immunotherapy. *Adv. Immunol.* **2016**, *130*, 75–93. [[PubMed](#)]
165. Colak, S.; Ten Dijke, P. Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends Cancer* **2017**, *3*, 56–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Guinney, J.; Dienstmann, R.; Wang, X.; de Reynies, A.; Schlicker, A.; Sonesson, C.; Marisa, L.; Roepman, P.; Nyamundanda, G.; Angelino, P.; et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1350–1356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Calon, A.; Espinet, E.; Palomo-Ponce, S.; Tauriello, D.V.; Iglesias, M.; Cespedes, M.V.; Sevillano, M.; Nadal, C.; Jung, P.; Zhang, X.H.; et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 571–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Calon, A.; Lonardo, E.; Berenguer-Llargo, A.; Espinet, E.; Hernando-Momblona, X.; Iglesias, M.; Sevillano, M.; Palomo-Ponce, S.; Tauriello, D.V.; Byrom, D.; et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 320–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Wei, Y.; Kim, T.J.; Peng, D.H.; Duan, D.; Gibbons, D.L.; Yamauchi, M.; Jackson, J.R.; Le Saux, C.J.; Calhoun, C.; Peters, J.; et al. Fibroblast-specific inhibition of TGF- β 1 signaling attenuates lung and tumor fibrosis. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 3675–3688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Principe, D.R.; DeCant, B.; Mascarinas, E.; Wayne, E.A.; Diaz, A.M.; Akagi, N.; Hwang, R.; Pasche, B.; Dawson, D.W.; Fang, D.; et al. TGF- β Signaling in the Pancreatic Tumor Microenvironment Promotes Fibrosis and Immune Evasion to Facilitate Tumorigenesis. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2525–2539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Tauriello, D.V.F.; Palomo-Ponce, S.; Stork, D.; Berenguer-Llargo, A.; Badia-Ramentol, J.; Iglesias, M.; Sevillano, M.; Ibiza, S.; Canellas, A.; Hernando-Momblona, X.; et al. TGF- β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* **2018**, *554*, 538–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Mariathasan, S.; Turley, S.J.; Nickles, D.; Castiglioni, A.; Yuen, K.; Wang, Y.; Kadel III, E.E.; Koeppen, H.; Astarita, J.L.; Cubas, R.; et al. TGF- β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* **2018**, *554*, 544–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Bhowmick, N.A.; Chytil, A.; Plieth, D.; Gorska, A.E.; Dumont, N.; Shappell, S.; Washington, M.K.; Neilson, E.G.; Moses, H.L. TGF- β signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent

epithelia. *Science* **2004**, 303, 848–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

174. Donkor, M.K.; Sarkar, A.; Li, M.O. TGF- β 1 produced by activated CD4(+) T Cells Antagonizes T Cell Surveillance of Tumor Development. *Oncoimmunology* **2012**, 1, 162–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

175. Fridlender, Z.G.; Sun, J.; Kim, S.; Kapoor, V.; Cheng, G.; Ling, L.; Worthen, G.S.; Albelda, S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* **2009**, 16, 183–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

176. Novitskiy, S.V.; Pickup, M.W.; Chytil, A.; Polosukhina, D.; Owens, P.; Moses, H.L. Deletion of TGF- β signaling in myeloid cells enhances their anti-tumorigenic properties. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, 92, 641–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

177. Park, B.V.; Freeman, Z.T.; Ghasemzadeh, A.; Chattergoon, M.A.; Rutebemberwa, A.; Steigner, J.; Winter, M.E.; Huynh, T.V.; Sebald, S.M.; Lee, S.J.; et al. TGF- β 1-Mediated SMAD3 Enhances PD-1 Expression on Antigen-Specific T Cells in Cancer. *Cancer Discov.* **2016**, 6, 1366–1381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

178. Stephen, T.L.; Payne, K.K.; Chaurio, R.A.; Allegranza, M.J.; Zhu, H.; Perez-Sanz, J.; Perales-Puchalt, A.; Nguyen, J.M.; Vara-Ailor, A.E.; Eruslanov, E.B.; et al. SATB1 Expression Governs Epigenetic Repression of PD-1 in Tumor-Reactive T Cells. *Immunity* **2017**, 46, 51–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

179. Garrison, K.; Hahn, T.; Lee, W.C.; Ling, L.E.; Weinberg, A.D.; Akporiaye, E.T. The small molecule TGF- β signaling inhibitor SM16 synergizes with agonistic OX40 antibody to suppress established mammary tumors and reduce spontaneous metastasis. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, 61, 511–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

180. Park, J.; Wrzesinski, S.H.; Stern, E.; Look, M.; Criscione, J.; Ragheb, R.; Jay, S.M.; Demento, S.L.; Agawu, A.; Licona Limon, P.; et al. Combination delivery of TGF- β inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat. Mater.* **2012**, 11, 895–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

181. Vanpouille-Box, C.; Diamond, J.M.; Pilonis, K.A.; Zavadil, J.; Babb, J.S.; Formenti, S.C.; Barcellos-Hoff, M.H.; Demaria, S. TGF- β Is a Master Regulator of Radiation Therapy-Induced Antitumor Immunity. *Cancer Res.* **2015**, 75, 2232–2242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

182. Courau, T.; Nehar-Belaid, D.; Florez, L.; Levacher, B.; Vazquez, T.; Brimaud, F.; Bellier, B.; Klatzmann, D. TGF- β and VEGF cooperatively control the immunotolerant tumor environment and the efficacy of cancer immunotherapies. *JCI Insight* **2016**, 1, e85974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

183. Hutzen, B.; Chen, C.Y.; Wang, P.Y.; Sprague, L.; Swain, H.M.; Love, J.; Conner, J.; Boon, L.; Cripe, T.P. TGF- β Inhibition Improves Oncolytic Herpes Viroimmunotherapy in Murine Models of Rhabdomyosarcoma. *Mol. Ther. Oncolytics* **2017**, 7, 17–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

184. Terabe, M.; Ambrosino, E.; Takaku, S.; O’Konek, J.J.; Venzon, D.; Lonning, S.; McPherson, J.M.; Berzofsky, J.A. Synergistic enhancement of CD8+ T cell-mediated tumor vaccine efficacy by an anti-transforming growth factor- β monoclonal antibody. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 6560–6569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

185. Ueda, R.; Fujita, M.; Zhu, X.; Sasaki, K.; Kasthuber, E.R.; Kohanbash, G.; McDonald, H.A.; Harper, J.; Lonning, S.; Okada, H. Systemic inhibition of transforming growth factor- β in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 6551–6559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

186. Takaku, S.; Terabe, M.; Ambrosino, E.; Peng, J.; Lonning, S.; McPherson, J.M.; Berzofsky, J.A. Blockade of TGF- β enhances tumor vaccine efficacy mediated by CD8(+) T cells. *Int. J. Cancer* **2010**, 126, 1666–1674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

187. Terabe, M.; Robertson, F.C.; Clark, K.; De Ravin, E.; Bloom, A.; Venzon, D.J.; Kato, S.; Mirza, A.; Berzofsky, J.A. Blockade of only TGF- β 1 and 2 is sufficient to enhance the efficacy of vaccine and PD-1 checkpoint blockade immunotherapy. *Oncoimmunology* **2017**, 6, e1308616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

188. Xu, Z.; Wang, Y.; Zhang, L.; Huang, L. Nanoparticle-delivered transforming growth factor- β siRNA enhances vaccination against advanced melanoma by modifying tumor microenvironment. *ACS Nano* **2014**, 8, 3636–3645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

189. Rooney, C.M.; Leen, A.M.; Vera, J.F.; Heslop, H.E. T lymphocytes targeting native receptors. *Immunol. Rev.* **2014**, 257, 39–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

190. Riviere, I.; Sadelain, M. Chimeric antigen receptors: A cell and gene therapy perspective. *Mol. Ther.* **2017**, 25, 1117–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

191. Barrett, D.M.; Singh, N.; Porter, D.L.; Grupp, S.A.; June, C.H. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annu. Rev. Med.* **2014**, 65, 333–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

192. Kloss, C.C.; Lee, J.; Zhang, A.; Chen, F.; Melenhorst, J.J.; Lacey, S.F.; Maus, M.V.; Fraietta, J.A.; Zhao, Y.; June, C.H. Dominant-Negative TGF- β Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication. *Mol. Ther.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

193. Wang, L.; Wen, W.; Yuan, J.; Helfand, B.; Li, Y.; Shi, C.; Tian, F.; Zheng, J.; Wang, F.; Chen, L.; et al. Immunotherapy for human renal cell carcinoma by adoptive transfer of autologous transforming growth factor- β -insensitive CD8+ T cells. *Clin. Cancer Res.* **2010**, 16, 164–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

194. Zhang, Q.; Yang, X.; Pins, M.; Javonovic, B.; Kuzel, T.; Kim, S.J.; Parijs, L.V.; Greenberg, N.M.; Liu, V.; Guo, Y.; et al. Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor- β -insensitive CD8+ T cells: Eradication of autologous mouse prostate cancer. *Cancer Res.* **2005**, 65, 1761–1769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

195. Foster, A.E.; Dotti, G.; Lu, A.; Khalil, M.; Brenner, M.K.; Heslop, H.E.; Rooney, C.M.; Bollard, C.M. Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF- β receptor. *J. Immunother.* **2008**, *31*, 500–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Zhang, Q.; Helfand, B.T.; Carneiro, B.A.; Qin, W.; Yang, X.J.; Lee, C.; Zhang, W.; Giles, F.J.; Cristofanilli, M.; Kuzel, T.M. Efficacy Against Human Prostate Cancer by Prostate-specific Membrane Antigen-specific, Transforming Growth Factor- β Insensitive Genetically Targeted CD8(+) T-cells Derived from Patients with Metastatic Castrate-resistant Disease. *Eur. Urol.* **2018**, *73*, 648–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Bollard, C.M.; Tripic, T.; Cruz, C.R.; Dotti, G.; Gottschalk, S.; Torrano, V.; Dakhova, O.; Carrum, G.; Ramos, C.A.; Liu, H.; et al. Tumor-specific T-cells engineered to overcome tumor immune evasion induce clinical responses in patients with relapsed hodgkin lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 1128–1139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.J.; Cowey, C.L.; Lao, C.D.; Schadendorf, D.; Dummer, R.; Smylie, M.; Rutkowski, P.; et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Nizard, M.; Roussel, H.; Diniz, M.O.; Karaki, S.; Tran, T.; Voron, T.; Dransart, E.; Sandoval, F.; Riquet, M.; Rance, B.; et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]