

ROLE DE CTLA-4 DANS LA COSIGNALISATION NÉGATIVE DU SYSTEME IMMUNITAIRE.

Daniel Olive^{1,2,3,4}, Suong le Thi ^{1,2,3,4}, Luc Xerri^{1,2,3}, Ivan Hirsch^{1,2,3}, Jacques A. Nunès^{1,2,3}

¹Institut national de la santé et de la recherche médicale, Unité 891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, F-13009, Marseille, France ; ²Institut Paoli-Calmettes, F-13009, Marseille, France ; ³Univ Méditerranée, F-13007, Marseille, France ; ⁴IBiSA Cancer Immunomonitoring Platform, 27 Bd Leï Roure, 13009 Marseille, France.

Introduction

La régulation des réponses immunes dépend de deux familles de gènes : la super-famille du TNF (*tumor necrosis factor*)/ TNF-R et celle des Immunoglobulines (IgSF). Ces molécules interagissent avec des ligands présents à la surface cellulaire qui vont réguler de façon positive (costimulation) ou négative (coinhibition), les fonctions immunes telles que prolifération et fonctions effectrices. Ces molécules régulent donc les réponses contre les agents pathogènes, les tumeurs ainsi que les réponses aux antigènes du soi (auto-immunité).

Dans le cas de la stimulation des lymphocytes T, la reconnaissance antigénique est assurée par le récepteur pour l'antigène (TcR) (appelé signal 1) et les molécules de costimulation optimisent les signaux transmis (signal 2). Au final, des signaux complémentaires apportés par les cytokines (signal 3) modulent la différenciation terminale, la survie et la mémoire immune. Ces notions reposent sur les observations

initiales de P. Bretscher et M. Cohn qui ont été modélisées par le groupe de R. Schwartz dans des clones T murins (1).

Parmi ces molécules de costimulation de la famille des Igs (IgSF), CD28 reste la protéine emblématique qui permet en particulier la costimulation de cellules CD4⁺ naïves. Ses ligands CD80 et CD86 appartiennent à la famille B7 et sont présents sur les cellules présentant l'antigène (CPA). *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen -4* (CTLA-4, CD152) a été identifiée comme une molécule partageant les mêmes ligands que CD28 mais présentant des fonctions inhibitrices. Les données actuelles convergent pour indiquer que les fonctions essentielles sont d'inhiber les fonctions de costimulation apportées par CD28 bien que des effets directs de CTLA-4 soient démontrés.

CTLA-4 est la première cible appartenant à la famille des molécules de cosignalisation qui soit rentrée dans l'ère thérapeutique avec les succès récents décrits dans une revue jointe dans ce même journal. Le concept de thérapies « inhiber les inhibiteurs » est ainsi appliqué et de ce fait, une nouvelle classe thérapeutique est née, en particulier en oncologie. Dans un premier temps, nous rappellerons les données associées aux fonctions de CD28, puis aborderons les données actuelles portant sur CTLA-4 (Figure 1).

Un accélérateur (costimulateur), la molécule CD28

En l'absence de mécanisme de costimulation (par ex. via CD28), la stimulation par le TcR se traduit souvent par une non-réponse, un état d'anergie ou la mort cellulaire (2). CD28 représentée par un homodimère de 44 kDa s'exprime à la surface de la plupart des T CD4⁺ et 50% des T CD8⁺ humains (3). Chez la souris, CD28 est exprimé sur l'ensemble des T CD4⁺ et CD8⁺. Les caractéristiques du signal de costimulation sont de permettre

une réponse immune même dans les cas de stimulation antigénique suboptimale. La costimulation par CD28 va augmenter la production de cytokines en particulier l'IL-2 et l'expression du récepteur de l'IL-2 par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (4, 5, 6, 7, 8). La costimulation par CD28 va augmenter la survie cellulaire par l'augmentation de l'expression des molécules anti-apoptotiques dont Bcl-X_L (9). L'existence de signaux apportés par CD28 indépendamment de l'activation antigénique a été l'objet de débats, des Acms anti-CD28 induisant directement l'activation lymphocytaire T ont été caractérisés, nommés superagonistes (10). L'analyse des bases des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels régulés par CD28 ont permis de démontrer que CD28 régula l'expression et l'activité des facteurs de transcription NFAT, NF-κB et AP-1 du promoteur du gène de l'IL-2 (11, 12). Si aucune activité enzymatique n'est démontrée dans la partie intra-cytoplasmique (IC) de CD28 (41 acides aminés chez l'homme), l'analyse de la séquence peptidique a permis d'identifier des motifs permettant de s'associer à des enzymes et des protéines adaptatrices impliqués dans la transmission du signal intracellulaire. Parmi les motifs les plus importants on peut citer YMNM qui rend compte après la phosphorylation de la tyrosine de la fixation des domaines SH2 de p85 de la *phosphoinositide 3'-kinase* (PI3K) et de Grb2 et GADS (13, 14, 15). Deux motifs riches en proline PRRP et PYAP recrutent les domaines SH3 des PTK Tec et Itk (PRRP) et Lck et Grb2 (PYAP) ainsi que la filamine A (FLNA) (16, 17, 18, 19, 20) (Figure 2). FLNA est une protéine de type échafaudage se fixant à l'actine dont le rôle est important pour l'activation T et en particulier le recrutement de PKC (21). Ces molécules vont induire des événements de signalisation qui vont impliquer des événements PI3K dépendants et indépendants, ces derniers étant

essentiellement associés aux fonctions adaptatrices du domaine IC de CD28. L'activité PI3K régule des fonctions comme la progression dans le cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, le métabolisme cellulaire et la production de cytokines (22 , 23). Cependant, le recrutement de Grb-2 et des PTK participent à la régulation des petites protéines GTPases et de réarrangements du cytosquelette (24). Une molécule de signalisation « pivot » dans le mécanisme d'action de CD28, correspond à la PKC- θ , son rôle a été précisé chez les souris *cd28*^{-/-} , par la corrélation entre l'absence de recrutement de la PKC- θ ainsi que la faible activation de NF- κ B et de la transcription du gène de l'IL-2 (25). La PKC- θ est recrutée par CD28 par un mécanisme impliquant le motif PYAP au niveau de la synapse immune (SI) (26) .

La stabilisation des ARNm codant pour les cytokines dépendrait aussi du motif intracytoplasmique PYAP et donc vraisemblablement de l'activation de Grb2 et des PTK comme Lck (22). L'ensemble de cette voie reste à analyser en détails. Donc l'ensemble des fonctions de CD28 est induit par une combinaison d'effets PI3K-dépendants et d'effets liés au recrutement de différentes protéines kinase / molécules adaptatrices .

CTLA-4 : Structure, Distribution cellulaire et tissulaire

CTLA-4 appartient comme CD28 à la Ig SF comme CD28 (27). Les deux gènes sont situés à proximité sur le chromosome 2q33 chez l'homme et le chromosome 1 chez la souris (28 , 29). Comme CD28, il forme des homodimères et fixe les ligands CD80 et CD86 (30 , 31) par des mécanismes impliquant le motif MYPPPY retrouvé dans le CDR3 de CTLA-4 (32), ce motif MYPPPY est également présent dans la région CDR3 du domaine extracellulaire de CD28 (33 , 34). L'affinité de l'interaction entre CTLA-4 et CD80 est

cependant supérieure à celle de CD28 (respectivement 12 et 200 nM)(35). Ce phénomène est lié à la capacité des homodimères de CTLA-4 de s'associer sous forme bivalente et de lier des molécules CD80 sous forme bivalente (36 , 37). Deux isoformes de CTLA-4 sont décrites en dehors de la forme complète, une forme sans domaine extracellulaire a été décrite chez la souris mais n'existe pas chez l'homme ainsi qu'une forme soluble dont l'expression est augmentée dans les maladies auto-immunes(sCTLA-4) . CTLA-4 est exprimé de façon intracellulaire dans les lymphocytes T, associé à la protéine *TcR-interacting protein* (TRIM) dans le réseau trans-golgien. Il apparaît à la surface cellulaire des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ conventionnels après activation. Son expression à la surface cellulaire est régulée par l'activité de la phospholipase D et la GTPase, ARF1. A la surface cellulaire, CTLA-4 est phosphorylée au niveau de la tyrosine du motif YVKM par les PTKs (Lck, Fyn et Rlk). Ce motif phosphorylé serait susceptible de recruter la PI3K ou une tyrosine phosphatase, SHP-2 ; ces interactions restent sujet à controverse. Cette phosphorylation est essentielle pour favoriser l'expression de surface de CTLA-4 et retarder son internalisation. En effet, une déphosphorylation permet la fixation de la protéine adaptatrice AP-2 au niveau du motif GVYVKM et induit son endocytose. Son expression de surface est aussi stabilisée par la présence de ses ligands par la CPA.

CTLA-4 est présent de façon constitutive à la surface des cellules T régulateurs (Treg). Son expression est aussi décrite à la surface d'autres cellules immunes (B activés, des monocytes et des cellules dendritiques matures) (38), mais aussi de fibroblastes, de cellules musculaires et de tumeurs. Dans ce cadre, sa fonction reste non connue, mais pourrait être importante en particulier pour les effets thérapeutiques des Acms.

Un frein (coïnhibiteur), la molécule CTLA-4.

CTLA-4 régule de multiples facettes des fonctions immunes dont la conséquence est le contrôle des fonctions immunes (39). Son rôle de régulateur négatif des fonctions immunes a été démontré par l'étude des souris *ctla-4*^{-/-} et l'utilisation d'Acms. Les souris *ctla-4*^{-/-} développent une activation et une prolifération massive des lymphocytes T. L'absence de CTLA-4 se traduit en particulier par une expansion des T CD4⁺. Les souris meurent de maladies vraisemblablement auto-immunes systémiques associées à l'infiltration de lymphocytes T activés de façon précoce dès la 3^{ème} semaine après leur naissance (40 , 41). Ces effets sont dépendant de la présence de CD28 et donc vraisemblablement de la costimulation. Les effets des Acms, depuis les travaux pionnier de P.S. Linsley jusqu'aux données actuelles, montrent que CTLA-4 est une molécule inhibant les fonctions immunes et régule l'expansion des effecteurs T CD8⁺ et le développement de cellules mémoires (39 , 42).

Dans certains modèles murins, les fonctions de CTLA-4 ont pu être dissociées entre les Tregs (expression constitutive) et les T conventionnels (T activés) par l'utilisation de souris exprimant le transgène *ctla-4* sous le contrôle du promoteur du gène *Il-2* chez des souris *ctla*^{-/-} (43). Ces modèles indiquent que CTLA-4 porté par les Treg est important pour réguler les fonctions immunosuppressives des Treg en association au TGFβ ϵ et de l'IL-10. Les conséquences étant une régulation de l'activation des T conventionnels aux antigènes du soi et de l'environnement. Dans d'autres modèles portant sur la tolérance aux antigènes du soi pancréatique, les deux types de mécanismes, Treg et T conventionnels, collaborent pour préserver la tolérance au soi (44).

Mécanismes impliqués dans les fonctions de CTLA-4

Les données *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les mécanismes d'immunosuppression siègent à différents niveaux : 1) des mécanismes de compétition pour la costimulation par CD28; 2) régulation de la signalisation cellulaire par l'intermédiaire de phosphatases ; 3) signaux activateurs apportés par CTLA-4.

1) Le rôle de compétition de CTLA-4 pour la fonction de costimulation de CD28 sont démontrées par i) des expériences de compétition pour l'accessibilité et la fixation des ligands communs à CD28 et CTLA-4 que sont CD80 et CD86 et ii) reposent sur les données montrant une compétition pour la localisation au niveau de la zone de contact T/APC appelée « synapse immune » (SI). La partie centrale (ou cSMAC) contient le TcR du côté T et les molécules du CMH côté APC, les molécules d'adhérence comme LFA-1 et ICAM sont situées en périphérie (pSMAC) (45 , 46 , 47). Les molécules de costimulation et de cosignalisation négatives se localisent au niveau de la SI. Ces phénomènes sont observés dans le cas de CD28, ICOS ainsi que CTLA-4 et PD-1 (48 , 49 , 50 , 51).

L'activation T et la costimulation se traduisent par la formation de microclusters correspondant au TcR associé à des molécules de signalisation (ZAP-70, SLP-76). La costimulation par CD28 recrute la protéine kinase C theta(52). Au sein du cSMAC deux sous-régions seraient identifiées qui se distingue selon la densité en TcR-CD3 en régions de hautes et basses densités en TcR-CD3 (CD3hi et CD3lo). Cette dernière région recrutant CD28 et PKC-theta(52). Pendant l'activation, CTLA-4 se retrouve à la SI au niveau de la région CD3lo où il entre en compétition avec le recrutement de CD28, empêchant ainsi le recrutement de la PKC-theta au niveau de la SI (53) (Figure 3). Ces

mécanismes sont à rapprocher des mécanismes montrant le rôle de CTLA-4 dans la régulation de la formation de rafts et le recrutement de ZAP-70. De même les mécanismes montrant une inhibition des signaux dit « stop » induits par le TcR décrit par le groupe de C. Rudd pourraient dépendre de cette inhibition d'une signalisation cellulaire efficace en conséquences de la prévention de la costimulation CD28 (54).

2) Le rôle du domaine intra-cytoplasmique de CTLA-4 dans ses fonctions immunosuppressives a été proposé. Les arguments princeps sont basés sur la démonstration que le phénotype des souris *ctla-4* *-/-* n'est pas prévenu par un transgène correspondant au gène de *ctla-4* sans domaine intra-cytoplasmique. Ces données indiquent que le domaine IC de *ctla-4* et donc les seconds messagers régulés sont importants pour sa fonction. De plus, Vijayakrishnan et col. ont décrit un variant d'épissage de CTLA-4 dépourvu de domaine extracellulaire de fixation à B7 mais inhibant les réponses immunes (55).

Le domaine IC de CTLA-4 est dépourvu d'un motif de type *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM). D'autre part, les motifs intra cytoplasmiques YVKM et riche en lysines sont impliqués dans l'interaction avec les phosphatases Src homology 2 (SH2)- domain containing tyrosine phosphatase 1 et 2 (SHP1 et SHP2) et PP2A respectivement (56 , 57). Ces interactions sont faibles et dans le cas de SHP-2 indirectes. D'autre part, PP2A s'associe aussi à CD28. La visualisation de l'interaction entre ces phosphatases et CTLA-4 et leurs fonctions restent à préciser.

3) CTLA-4 induit des signaux intra-cellulaires qui vont réguler des activités enzymatiques comme la PI3K et JNK sans que les bases structurales n'en soient clairement apportées . Les conséquences fonctionnelles sont mal connues. Par ailleurs, la

stimulation de CTLA-4 régule les fonctions de l'intégrine LFA-1 en augmentant son adhérence à ses ligands. Ainsi, CTLA-4 participerait à la migration cellulaire et régulerait le trafic des lymphocytes activés vers les tissus périphériques en particulier dans les contextes inflammatoires (58).

Pour conclure, les conséquences de l'engagement de CTLA-4 se traduisent par une inhibition de l'activation des T CD4⁺ et de la progression dans le cycle cellulaire. CTLA-4 pourrait augmenter le seuil d'activation des lymphocytes T et donc les mécanismes d'auto-immunité liés aux antigènes du soi de faible affinité.

En dehors des lymphocytes T, les fonctions de CTLA-4 restent à découvrir. Ainsi, les Acms anti- CTLA-4 induisent la production d'IL-10 et inhibent la production d'IL-8 par les cellules dendritiques matures (38). Leur rôle serait d'atténuer les réponses immunes en combinaison avec les effets décrits sur les lymphocytes T.

CTLA-4 et modèles pré-cliniques

Dès 1996, le laboratoire de J. Allison démontrait que les Acms utilisés en monothérapie anti-CTLA-4 induisaient l'élimination de tumeurs (59). Dans certains modèles, le rejet des tumeurs transplantées permettait d'obtenir une protection contre une autre greffe tumorale indiquant la génération d'une immunité anti-tumorale dotée d'une mémoire. Les données pré-cliniques montrent que l'anti-CTLA-4 isolément est capable d'induire l'élimination de tumeurs immunogéniques cependant les tumeurs peu ou non immunogéniques nécessitent la mise en place des thérapies combinées avec du GM-CSF ou avec des vaccins thérapeutiques, la déplétion des Treg, des chimiothérapies ou

l'association à d'autres immunothérapies (anti-PD1) (60). La régression tumorale est induite par le système immunitaire dans la mesure où les effets de l'anti-CTLA-4 sont perdus chez les souris dépourvues de lymphocytes T. L'expression constitutive de CTLA-4 sur les cellules sur les Treg ont amené à proposer que l'élimination de la suppression induite par les Treg pourrait expliquer l'activité thérapeutique des anti-CTLA-4. Les données actuelles ne sont pas en faveur de cette hypothèse, mais plutôt en faveur de modifications du rapport des cellules effectrices sur celui des cellules Treg, en particulier dans la tumeur.

Les modèles murins sont en faveur du rôle des T CD8⁺ pour développer l'effet thérapeutique en combinaison avec les T CD4⁺. Les modèles animaux ont montré peu de pathologies auto-immunes associées en dehors de vitiligo auto-immun dans le modèle non immunogénique B16 (61). Ces données ne préfiguraient que partiellement les données cliniques trouvées chez les patients traités par anti-CTLA-4.

Ces modèles ont permis de préciser les contributions respectives de CTLA-4 porté par les cellules T conventionnelles et les Treg. Dans le cadre des modèles animaux de réponses anti-tumorales, les T conventionnels sont les acteurs préférentiels de l'action des anti-CTLA-4 (62, 63)

.

CTLA-4 et les autres mécanismes de cosignalisation

La découverte de nombreuses molécules de cosignalisation après CTLA-4 peut sembler surprenante. Mais, les données d'inactivation génique chez la souris indiquent que ces molécules régulent les mécanismes de tolérance du soi et d'auto-immunité avec des cinétiques et des intensités différentes (CTLA-4, PD-1, BTLA, HVEM) (64) (Figure 4). Les

données phénotypiques obtenues *in vitro* ou *in vivo* chez patients présentant des infections virales chroniques ou des cancers indiquent que les cellules immunes activées peuvent coexprimer différentes molécules de cosignalisation négatives comme CTLA-4 mais aussi PD-1, BTLA, LAG3, CD160 et Tim-3. Ces molécules sont activées par des ligands différents mais qui peuvent être coexprimés par les même cellules, CPA ou cellules tumorales (par exemple dans les cas des ligands, PD-L1 et CD80). Les données fonctionnelles démontrent une coopération des molécules correspondantes.

Cette régulation croisée a dans certains cas des bases biochimiques. Ainsi si CD80 est le ligand de CD28 et CTLA-4, il est aussi le ligand de PDL-1. Ces données suggèrent que les molécules de cosignalisation pourraient se réguler de façon croisée (dans ce cas particulier, i) activer via CD28, ii) ou inhiber via CTLA-4 et en même temps iii) empêcher l'inhibition induite par PD-1). Ces paramètres montrent s'il en était besoin, la subtilité des régulations immunes et la difficulté à prédire dans un mode binaire leurs conséquences dans des modèles physiologiques.

BTLA diffère des molécules de cosignalisation « classiques » c'est à dire régulées positivement par l'activation et la différenciation cellulaire par son expression préférentielle sur les cellules T naïves (65, 66). Ses fonctions s'étendent de la cosignalisation négative à la régulation de la survie cellulaire et aux fonctions des T cytotoxiques.

Les signaux intracellulaires impliqués dans ces différents systèmes sont distincts de ceux impliquant CTLA-4 par exemple PD-1 et BTLA induisent leurs fonctions par l'existence de motifs de type ITIM et *immunoreceptor based switch motif* (ISTM) retrouvés dans leur domaine IC.

Les conséquences fonctionnelles des blocages combinés ont été évaluées dans des modèles pré-clinique en particulier dans le cas de PD-1 et CTLA-4 dans le but d'améliorer les réponses immunes anti-virales et anti-tumorales. Dans un de ces modèles, Curran et col. ont observé une augmentation de l'infiltration des cellules T effectrices et de leurs capacités fonctionnelles (60).

Mécanismes d'action *in vivo* et prédicteurs de réponses cliniques

Les mécanismes d'action des Acms anti-CTLA-4 *in vivo* reposent sur le fait que ces Acms inhibant l'interaction entre CTLA-4 et ses ligands, devraient prévenir les signaux apportés par CTLA-4 quels qu'ils soient. Les observations chez les patients traités par les Acms thérapeutiques indiquent que le ciblage de CTLA-4 par les deux Acms en cours d'étude tremelimumab et ipilumimab se traduit par des manifestations inflammatoires indiquant une activation immune (67). Les effets secondaires correspondent à des atteintes de type colite, prurit, hypothyroïdies, nécroses hypophysaires. Ces manifestations sont en faveur de réactions auto-immunes. Les données cliniques indiquent que les réponses cliniques sont associées aux manifestations immunes pouvant conduire à l'autoimmunité. Ces données confirment que les réponses immunes et/ou inflammatoires, sans que le rôle des lymphocytes T puisse être spécifiquement montré, peuvent contrôler un cancer avancé jusqu'à induire dans certains cas, une réponse clinique complète.

Les paramètres biologiques de réponses aux Acms de type anti-CTLA-4 sont un enjeu important. Ils doivent pouvoir sélectionner les patients pouvant bénéficier de ces thérapies afin d'éviter les effets secondaires dont certains sont délétères chez les

patients. D'autre part, leur identification doit permettre de proposer des combinaisons thérapeutiques chez les patients résistants en particulier par d'autres « inhibiteurs d'inhibiteurs » comme des Acms anti-PD-1 ou des thérapies complémentaires. Les paramètres associés à la réponse restent peu discriminants, ils correspondent à l'augmentation des lymphocytes en particulier de l'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral et de marqueurs d'activation comme ICOS ainsi que la diminution d'autres facteurs immunosuppresseurs que ce soit l'expression de FoxP3 ou d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO).

Les frontières.

Les questions restent nombreuses portant tant sur les fonctions de CTLA-4 que son utilisation thérapeutique. Parmi celles-ci, on peut indiquer les fonctions de CTLA-4 sur les autres cellules immunes « non-T » et non immunes. Leur importance fonctionnelle de ces cellules et leur rôle dans l'action des Acms thérapeutiques. Le rôle de CTLA-4 dans les fonctions des cellules différenciées au delà des T activés et des Treg en particulier les Th17, T_{FH} et les autres sous-populations effectrices en cours de démantèlement. Le démantèlement des coopérations des voies de cosignalisation sont la suite logique des démonstrations de leur coopération dans des modèles *in vitro* et pré-cliniques (60). Leur utilisation va commencer sous peu en particulier dans les formes résistantes aux anti-CTLA-4. Dans ces stratégies de blocage des inhibiteurs : l'inhibition des molécules TGFβ_{εα}, le ciblage des Treg, des mécanismes enzymatiques (IDO, Arginase 1) ainsi que des cellules myéloïdes précurseurs suppressives sont un enjeu important. Du point de vue pharmacologique, la dissection des voies métaboliques et événements cellulaires

régulés par CTLA-4 reste un objectif important pour enrichir nos stratégies thérapeutiques autour de ces molécules qui sont au centre de la régulation des réponses immunes en physiologie et en pathologie.

1. Schwartz RH. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71: 1065-8
2. Linsley PS, Ledbetter JA. 1993. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 11: 191-212
3. Aruffo A, Seed B. 1987. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8573-7
4. Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH. 1989. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 1333-7
5. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 173: 721-30
6. Cerdan C, Martin Y, Courcoul M, Mawas C, Birg F, Olive D. 1995. CD28 costimulation up-regulates long-term IL-2R beta expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J Immunol* 154: 1007-13
7. Cerdan C, Martin Y, Courcoul M, Mawas C, Birg F, Olive D. 1995. CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. *Res Immunol* 146: 164-8
8. Cerdan C, Martin Y, Courcoul M, Brailly H, Mawas C, Birg F, Olive D. 1992. Prolonged IL-2 receptor alpha/CD25 expression after T cell activation via the adhesion molecules CD2 and CD28. Demonstration of combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J Immunol* 149: 2255-61
9. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3: 87-98
10. Tacke M, Hanke G, Hanke T, Hunig T. 1997. CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol* 27: 239-47
11. Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. 1991. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251: 313-6
12. Granelli-Piperno A, Nolan P. 1991. Nuclear transcription factors that bind to elements of the IL-2 promoter. Induction requirements in primary human T cells. *J Immunol* 147: 2734-9
13. Pages F, Ragueneau M, Rottapel R, Truneh A, Nunes J, Imbert J, Olive D. 1994. Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* 369: 327-9

14. Schneider H, Cai YC, Prasad KV, Shoelson SE, Rudd CE. 1995. T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. *Eur J Immunol* 25: 1044-50
15. Raab M, Cai YC, Bunnell SC, Heyeck SD, Berg LJ, Rudd CE. 1995. p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8891-5
16. King PD, Sadra A, Teng JM, Xiao-Rong L, Han A, Selvakumar A, August A, Dupont B. 1997. Analysis of CD28 cytoplasmic tail tyrosine residues as regulators and substrates for the protein tyrosine kinases, EMT and LCK. *J Immunol* 158: 580-90
17. Okkenhaug K, Rottapel R. 1998. Grb2 forms an inducible protein complex with CD28 through a Src homology 3 domain-proline interaction. *J Biol Chem* 273: 21194-202
18. Marengere LE, Okkenhaug K, Clavreul A, Couez D, Gibson S, Mills GB, Mak TW, Rottapel R. 1997. The SH3 domain of Itk/Emt binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of the T cell costimulatory receptor CD28. *J Immunol* 159: 3220-9
19. Tavano R, Contento RL, Baranda SJ, Soligo M, Tuosto L, Manes S, Viola A. 2006. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol* 8: 1270-6
20. Yang WC, Ghiotto M, Barbarat B, Olive D. 1999. The role of Tec protein-tyrosine kinase in T cell signaling. *J Biol Chem* 274: 607-17
21. Hayashi K, Altman A. 2006. Filamin A is required for T cell activation mediated by protein kinase C-theta. *J Immunol* 177: 1721-8
22. Sanchez-Lockhart M, Marin E, Graf B, Abe R, Harada Y, Sedwick CE, Miller J. 2004. Cutting edge: CD28-mediated transcriptional and posttranscriptional regulation of IL-2 expression are controlled through different signaling pathways. *J Immunol* 173: 7120-4
23. Miller J, Baker C, Cook K, Graf B, Sanchez-Lockhart M, Sharp K, Wang X, Yang B, Yoshida T. 2009. Two pathways of costimulation through CD28. *Immunol Res*
24. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. 2009. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* 229: 12-26
25. Huang J, Lo PF, Zal T, Gascoigne NR, Smith BA, Levin SD, Grey HM. 2002. CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9369-73
26. Saito T, Yokosuka T, Hashimoto-Tane A. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS Lett* 584: 4865-71
27. Brunet JF, Denizot F, Golstein P. 1988. A differential molecular biology search for genes preferentially expressed in functional T lymphocytes: the CTLA genes. *Immunol Rev* 103: 21-36
28. Lafage-Pochitaloff M, Costello R, Couez D, Simonetti J, Mannoni P, Mawas C, Olive D. 1990. Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34. *Immunogenetics* 31: 198-201
29. Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P. 1991. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and

- human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 147: 1037-44
30. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174: 561-9
 31. Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes RJ. 1993. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* 262: 905-7
 32. Balzano C, Buonavista N, Rouvier E, Golstein P. 1992. CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *Int J Cancer Suppl* 7: 28-32
 33. Peach RJ, Bajorath J, Brady W, Leytze G, Greene J, Naemura J, Linsley PS. 1994. Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J Exp Med* 180: 2049-58
 34. Truneh A, Reddy M, Ryan P, Lyn SD, Eichman C, Couez D, Hurle MR, Sekaly RP, Olive D, Sweet R. 1996. Differential recognition by CD28 of its cognate counter receptors CD80 (B7.1) and B70 (B7.2): analysis by site directed mutagenesis. *Mol Immunol* 33: 321-34
 35. van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ. 1997. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 185: 393-403
 36. Ikemizu S, Gilbert RJ, Fennelly JA, Collins AV, Harlos K, Jones EY, Stuart DI, Davis SJ. 2000. Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. *Immunity* 12: 51-60
 37. Stamper CC, Zhang Y, Tobin JF, Erbe DV, Ikemizu S, Davis SJ, Stahl ML, Seehra J, Somers WS, Mosyak L. 2001. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* 410: 608-11
 38. Laurent S, Carrega P, Saverino D, Piccioli P, Camoriano M, Morabito A, Dozin B, Fontana V, Simone R, Mortara L, Mingari MC, Ferlazzo G, Pistillo MP. 2010. CTLA-4 is expressed by human monocyte-derived dendritic cells and regulates their functions. *Hum Immunol*
 39. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405-13
 40. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3: 541-7
 41. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl-4. *Science* 270: 985-8
 42. Pedicord VA, Montalvo W, Leiner IM, Allison JP. 2010. Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8+ T-cell memory formation, function, and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 266-71
 43. Jain N, Nguyen H, Chambers C, Kang J. 2010. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1524-8

44. Ise W, Kohyama M, Nutsch KM, Lee HM, Suri A, Unanue ER, Murphy TL, Murphy KM. 2010. CTLA-4 suppresses the pathogenicity of self antigen-specific T cells by cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Nat Immunol* 11: 129-35
45. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395: 82-6
46. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285: 221-7
47. Dustin ML. 2010. Insights into function of the immunological synapse from studies with supported planar bilayers. *Curr Top Microbiol Immunol* 340: 1-24
48. Egen JG, Allison JP. 2002. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16: 23-35
49. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21: 401-13
50. Fos C, Salles A, Lang V, Carrette F, Audebert S, Pastor S, Ghiotto M, Olive D, Bismuth G, Nunes JA. 2008. ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol* 181: 1969-77
51. Pentcheva-Hoang T, Chen L, Pardoll DM, Allison JP. 2007. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17765-70
52. Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, Tokunaga M, Saito T. 2008. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* 29: 589-601
53. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, Yagita H, Tokunaga M, Saito T. 2010. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity* 33: 326-39
54. Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, Wei B, Hogg N, Garside P, Rudd CE. 2006. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* 313: 1972-5
55. Vijayakrishnan L, Slavik JM, Illes Z, Greenwald RJ, Rainbow D, Greve B, Peterson LB, Hafler DA, Freeman GJ, Sharpe AH, Wicker LS, Kuchroo VK. 2004. An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity* 20: 563-75
56. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA. 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282: 2263-6
57. Chuang E, Fisher TS, Morgan RW, Robbins MD, Duerr JM, Vander Heiden MG, Gardner JP, Hambor JE, Neveu MJ, Thompson CB. 2000. The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13: 313-22
58. Knieke K, Hoff H, Maszyzna F, Kolar P, Schrage A, Hamann A, Debes GF, Brunner-Weinzierl MC. 2009. CD152 (CTLA-4) determines CD4 T cell migration in vitro and in vivo. *PLoS One* 4: e5702

59. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271: 1734-6
60. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. 2010. 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* 107: 4275-80
61. van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. 1999. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190: 355-66
62. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, Blasberg R, Yagita H, Muranski P, Antony PA, Restifo NP, Allison JP. 2009. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 207: 637-50
63. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. 2009. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med* 206: 1717-25
64. Sharpe AH. 2009. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 229: 5-11
65. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, Hurchla MA, Zimmerman N, Sim J, Zang X, Murphy TL, Russell JH, Allison JP, Murphy KM. 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol* 4: 670-9
66. Serriari NE, Gondois-Rey F, Guillaume Y, Remmerswaal EB, Pastor S, Messal N, Truneh A, Hirsch I, van Lier RA, Olive D. 2010. B and T lymphocyte attenuator is highly expressed on CMV-specific T cells during infection and regulates their function. *J Immunol* 185: 3140-8
67. Weber J. 2007. Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events. *Oncologist* 12: 864-72

Légendes des figures

Figure 1 Fonctions immunorégulatrices des CTLA-4

Figure 2 Pharmacologie de la costimulation par CD28 indépendamment de la PI3K

Figure 3 3 Mécanismes d'inhibition de la costimulation médiée par CD28 induite par CTLA-4

Figure 4 Mécanismes de costimulation et de coinhibition

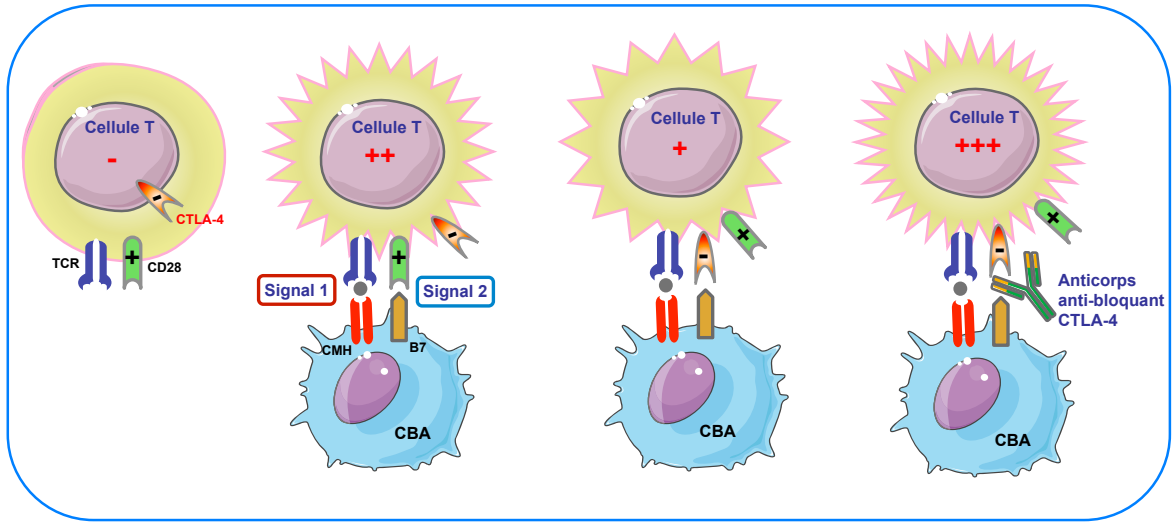


Figure 1 Fonctions immunorégulatrices des CTLA-4

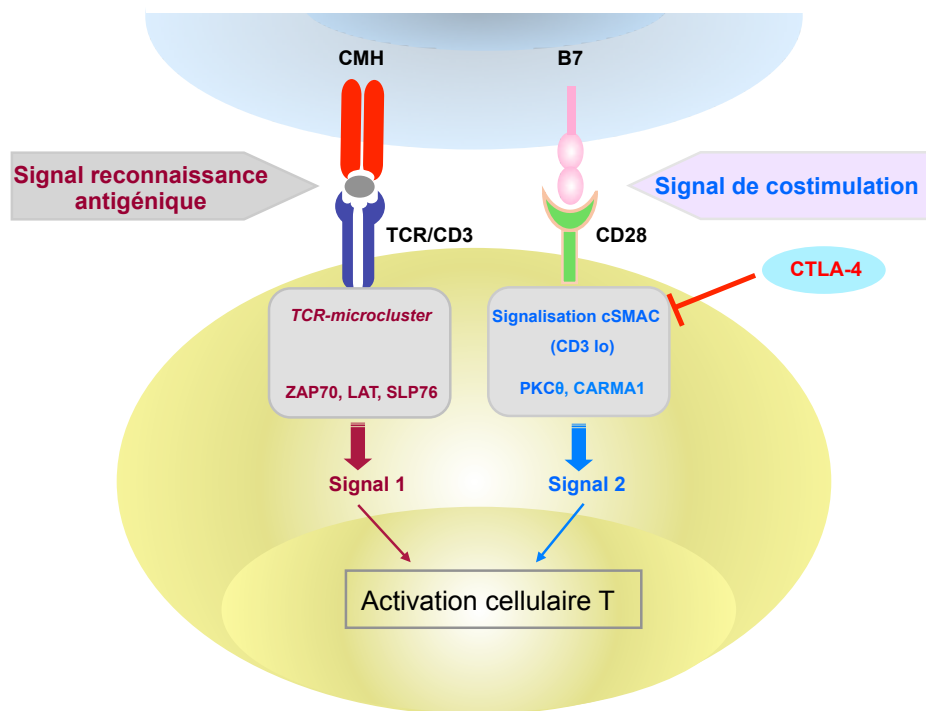


Figure 2: Pharmacologie de la costimulation par CD28 indépendamment de la PI3K

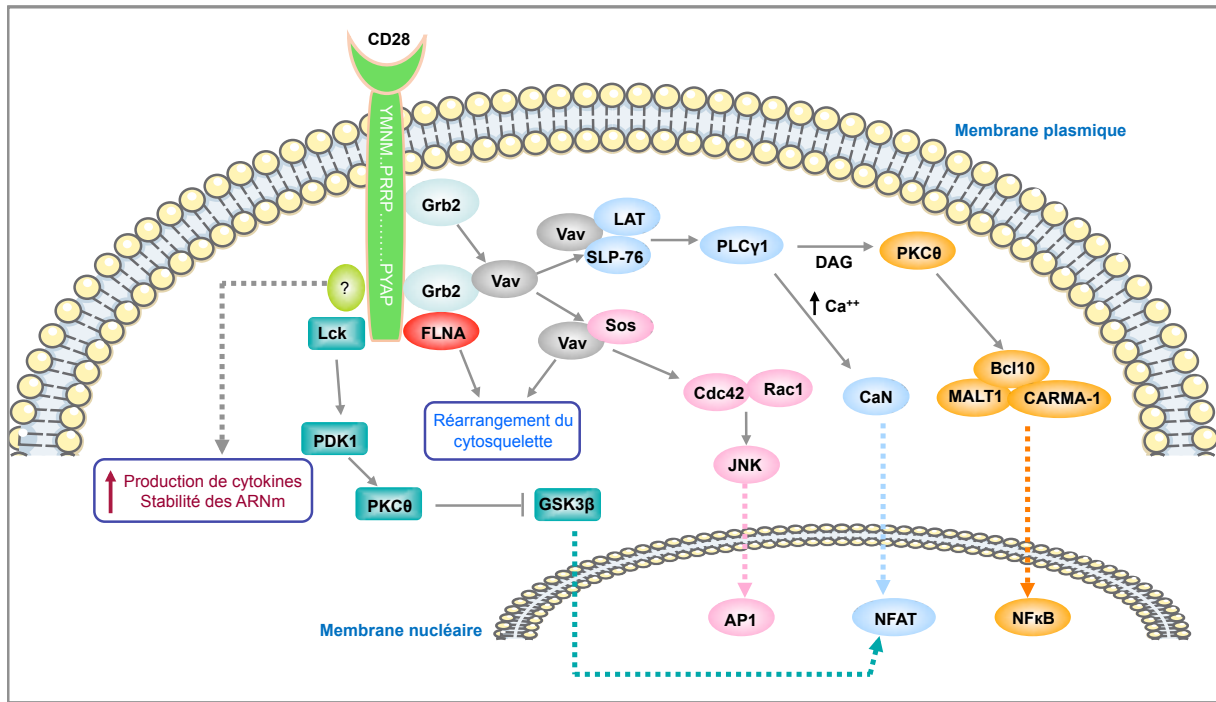


Figure 3 Mécanismes d'inhibition de la costimulation médiée par CD28 induite par CTLA-4

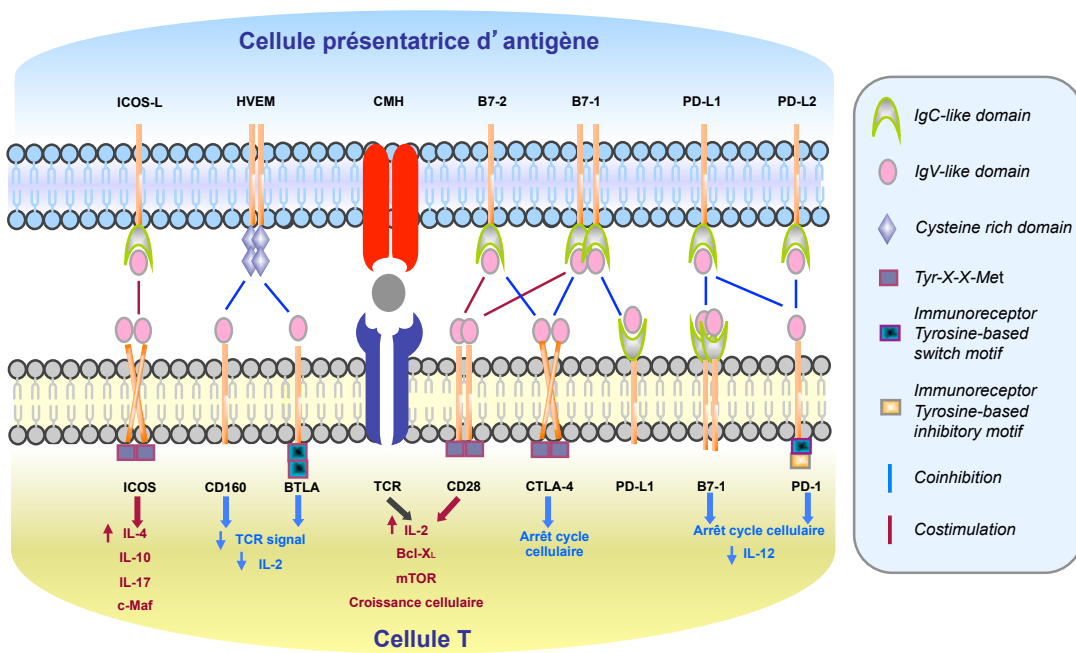


Figure 4: Mécanismes de costimulation et de coïnhibition